

**BIOCHEMISCHE ANALYSE
VON HLA KLASSE I-VARIANTEN**

Erich Lederer

isbui. München

988



BIOCHEMISCHE ANALYSE VON HLA KLASSE I-VARIANTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Erich Lederer
aus München

München, Juni 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gutensohn
Sondergutachterin: Prof. Dr. D. J. Schendel

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1988

Meinen Eltern gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

β_2 -Mg	β_2 -Mikroglobulin
B-LCL	Lymphoblastoide B-Zelllinie
Bf	Menschlicher Properdinfaktor F
C2	Menschlicher Komplementfaktor 2
C4	Menschlicher Komplementfaktor 4
CHAPSO	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)- 2-hydroxy-1-propansulfonat
Ci	Curie
CML	Zellvermittelter Zytotoxizitätstest (Cell-mediated lympholysis)
CMV	Zytomegalie-Virus
CTL	Zytotoxische T-Lymphocyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Einheit(en) (Maßeinheit)
EBNA	Nukleäres Antigen des Epstein-Barr-Virus
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Antikörperbindungstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
Fc-Teil	Konstanter Bereich der schweren Kette des Immunglobulins
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Glo	Glyoxylase
h	Stunde
H-2	Histokompatibilitätskomplex der Maus
HLA	Menschliches Histokompatibilitätsantigen (Human Leucocyte Antigen)

1 D-IEF	Eindimensionale Isoelektrofokussierung
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
kD	kilodalton
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min.	Minuten
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	Phosphatgepufferte Salinelösung
PHA	Phythämagglutinin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen/Minute
SAC	Staphylococcus aureus Zellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Ti	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
(v/v)	Volumen, bezogen auf Volumen
(w/v)	Gewicht, bezogen auf Volumen

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	12
Reagenzien	12
Häufig verwendete Medien und Puffer	13
Fotomaterialien	15
Verwendete Antikörper	15
Verwendete Zellen	16
Verwendete Methoden	16
Gewinnung von PHA-Blasten	16
Radioaktive Markierung von Zellen	16
Zellyse	17
SDS-PAGE	18
Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose	19
Präparation von fixierten Staphylococcus aureus Zellen	19
Neuraminidase-Behandlung	21
Isoelektrofokussierung	21
Immunpräzipitation mittels Crosslinking	22
Indirekte Immunfluoreszenz	23
ERGEBNISSE	24
1. Parameter für die biochemische Analyse von HLA-Klasse I-Proteinen	24
Verwendete Zellen	24
Radioaktive Markierung der Zellen	25
Detergentien für die Lyse der Zellen	27
Preclearing des Lysats	29
Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern	30
Waschen der Präzipitate	32
Neuraminidasebehandlung	32
Isoelektrofokussierung	33

2. Biochemische Analyse von Varianten des HLA-B35 Antigenen	34
<i>Analyse von verschiedenen CTL-definierten B35-Subtypen</i>	34
<i>B35-Subtypen eines Münchner Blutspenderpanels</i>	39
<i>Assoziation mit zellulär definierten Subtypen</i>	43
<i>Assoziation mit B35/B44-kreuzreagierenden zytotoxischen T-Lymphocyten</i>	45
<i>Assoziation mit anderen Antigenen des HLA-Komplexes</i>	46
<i>Assoziation von B35-Subtypen zu Krankheiten - Subakute Thyreoiditis (De Quervain)</i>	47
3. Biochemische Analyse von Varianten des HLA-B44 Antigenen	50
<i>Untersuchung durch 1 D-IEF</i>	50
<i>Assoziation mit zellulär definierten Subtypen</i>	52
4. Antigen-Mimikry - Charakterisierung von HLA-B8	53
5. Biochemische Charakterisierung von seltenen HLA-Antigenen	58
6. Darstellung von Produkten des HLA C-Lokus durch 1 D-Isoelektrofokussierung	58
7. Antigen-Mimikry - Charakterisierung von CTL-Determinanten durch monoklonale Antikörper	60
(A) Klasse II-Region	60
<i>Immunpräzipitation und PAGE</i>	61
<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	63
<i>Inhibierung der Präzipitation durch Preclearing</i>	67
(B) Klasse I-Region	70
<i>Eine neue Technik zur Immunpräzipitation von HLA-Antigenen</i>	72
DISKUSSION	74
ZUSAMMENFASSUNG	86
LITERATURVERZEICHNIS	88

EINLEITUNG

Struktur von MHC-Antigenen

Antigene des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC = Major Histocompatibility Complex) sind Glycoproteine, die auf der Oberfläche fast aller menschlichen Zellen vorkommen. Neben den gut charakterisierten Produkten der humanen HLA- (= human leucocyte antigen) und der murinen H-2-Gene sind diese Membranproteine in allen bisher untersuchten Vertebraten zu finden (Götze, 1977). Eine ihrer Eigenschaften ist ihr überaus großer Polymorphismus (Klein, 1979), dessen Ausmaß auf Proteinebene bei Wirbeltieren einzigartig ist.

Erstmals vor mehr als fünfzig Jahren wurden von Peter Gorer "Maus Blutgruppenantigene-2" beschrieben, die für die Abstoßung oder Annahme von Hauttransplantaten bei Mäusen verantwortlich sind. Unterschiedliche Allele auf einer Reihe von Genorten des Spenders und des Empfängers führen zur Abstoßung von transplantierten Geweben. Im folgenden konnte der H-2- und der HLA-Komplex durch serologische Reagenzien genauer charakterisiert werden. Bei Gewebeunverträglichkeit produzieren Mäuse nach Immunisierung mit lymphoiden Zellen oder nach Hautverpflanzung Antikörper gegen H-2-Produkte des Spenders, Antikörper gegen HLA-Antigene werden aus Schwangeren gewonnen, in denen der Fötus Antigene des väterlichen (unverträglichen) Haplotyps exprimiert. In den letzten Jahren ermöglichten monoklonale Antikörper eine noch genauere und reproduzierbare Analyse dieser Membranmoleküle.

Im menschlichen MHC lassen sich drei Genfamilien unterscheiden, die Proteine mit unterschiedlichen Funktionen kodieren:

Die Faktoren C4, C2 und Bf bilden zusammen mit anderen Mitgliedern des Komplementsystems einen Komplex, der in Verbindung mit Antikörpern in der Lage ist, Zellmembranen zu lysieren.



Die HLA Klasse II-Loci DP, DQ und DR kodieren für Heterodimere (α -Kette: 33kD; β -Kette 28kD), die nicht auf allen Körperzellen, sondern vor allem auf Makrophagen und B-Lymphocyten exprimiert werden. Diese Zellen spielen bei der zellulären Immunantwort eine große Rolle, da sie Fremd-Antigen in Zusammenhang mit Klasse II-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dieser Komplex wird im allgemeinen von den sogenannten T-Helferzellen erkannt, deren Aktivierung ein Teil der zellulären Immunreaktion ist.

Klasse I-Antigene (HLA-A, -B, -C) setzen sich ebenso wie bei Klasse II-Antigenen aus zwei Ketten zusammen. Die schwere Kette (44kD) wird von Genen kodiert, die sich in Nachbarschaft zur Klasse III- und Klasse II-kodierenden Region befinden (dazu gehören auch die Gene für den Tumor-Nekrose-Faktor TNF sowie die Steroid-21-Hydroxylase, 21 A und B). Der gesamte Genkomplex befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 zwischen den Abschnitten p21.1 und p21.3 (Morton et al., 1984; Carroll et al., 1987). Eine schematische Darstellung dieser Region zeigt Abbildung 1.

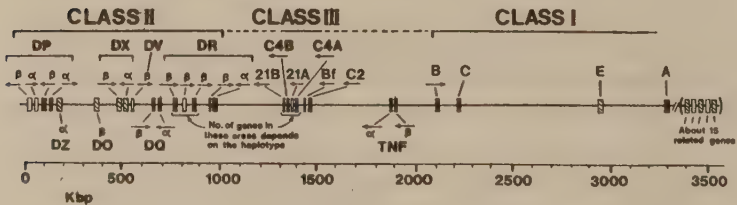


Abbildung 1: Anordnung der Gene im MHC des Menschen (aus Trowsdale und Campbell, 1988)

21A/B = Steroid-21-Hydroxylase

TNF = Tumor-Nekrose-Faktor

—■— = Proteinkodierende Gene

—□— = Pseudogene

—◻— = Gene mit bisher unbekanntem Status

Die leichte Kette der Klasse I-Antigene ist das 12 kD schwere β_2 -Mikroglobulin (Berggård und Bearn, 1968; Cresswell et al., 1973; Grey et al., 1973), das kaum polymorph ist und auf Chromosom 15 kodiert wird (Goodfellow et al., 1975).

Erst vor kurzem wurde eine exakte Strukturaufklärung durch Röntgenkristallographie des HLA A2-Moleküls möglich gemacht (Bjorkman et al., 1987a). Eine schematische Darstellung des gesamten Dimers ist in Abbildung 2 zu sehen. Die schwere Kette besteht aus drei Domänen (α_1 , α_2 und α_3), die jeweils etwa 90 Aminosäuren umfassen sowie einem Transmembran- und einem zytoplasmatischen Teil, der noch einmal ca. 70 Aminosäuren enthält (Lopez di Castro et al., 1979; Orr et al., 1979). Die nicht kovalente Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin ist notwendig, um die Glykosylierung und die Expression des gesamten Antigens auf der Zelloberfläche zu ermöglichen (Owen et al., 1980; Krangel et al., 1983).

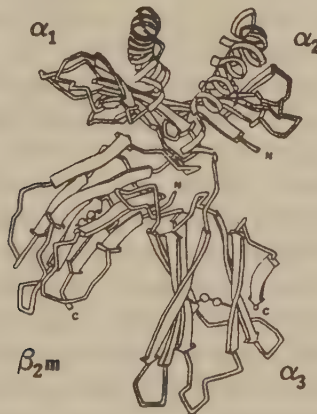
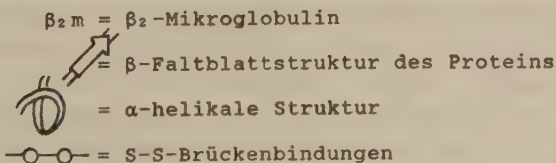


Abbildung 2: Schematische Struktur des HLA A2-Molekül entsprechend der van der Waals-Oberflächenrepräsentation (aus Bjorkman et al., 1987a)



Polymorphismus des MHC

Der hohe Polymorphismus des menschlichen HLA-Systems zeigt sich sowohl innerhalb eines Individuums als auch innerhalb einer Population.

Die drei gut untersuchten Klasse I-Loci HLA-A, -B und -C kodieren bei Heterozygoten sechs verschiedene Antigene, dazu kommen je zwei Klasse II-Produkte von DP, DQ und DR sowie verschiedene Allele von "nichtklassischen" und erst im Ansatz charakterisierten Loci.

Durch die große Variation von Allelen eines Locus entsteht innerhalb einer Population eine solche Vielzahl an Kombinationen dieser Antigene, daß die Wahrscheinlichkeit einer HLA-Identität zwischen unverwandten Personen nahezu null ist.

Funktion von MHC-Antigenen

Ebenso wie bei der Klasse II-vermittelten Erkennung werden virale Fremd-Antigene auf der Oberfläche der infizierten Zelle von T-Lymphocyten zusammen mit Klasse I-Produkten erkannt, ein Phänomen, das auch als MHC-restringierte Erkennung bekannt ist (Zinkernagel und Doherty, 1974). Anders als bei Klasse II-Antigenen sind die Effektorzellen in diesem Fall nicht T-Helferzellen, sondern zytotoxische T-Lymphocyten (CTL).

Untersuchungen dieser Antigenerkennung ergaben, daß diese Fremd-Antigene nicht als native dreidimensionale Strukturen gesehen werden, sondern zuvor intrazellulär zu kurzen Peptiden prozessiert werden (Shimonkevitz et al., 1983). Bei murinen und humanen Klasse II-Antigenen konnte eine direkte Bindung solcher Peptide an das MHC-Molekül mit mikromolaren Dissoziationskonstanten nachgewiesen werden (Babbitt et al., 1985; Buus et al., 1986; Jardetzky et al., unveröffentlichte Daten). Virusspezifische CTL können uninfizierte Zielzellen einer bestimmten Klasse I-Spezifität auch dann erkennen, wenn Peptidfragmente von viralem Protein hinzugefügt werden (Townsend et al., 1986).

In der Kristallstruktur des A2-Moleküls zeigte sich zwischen der α_1 - und der α_2 -Domäne eine tiefe Rinne,

die distal vom Membranteil des Proteins liegt und in Größe und Form einer möglichen Peptidbindungsstelle entspricht (vergleiche auch Abbildung 2). Die Aminosäuresequenzen verschiedener Klasse I-Antigene zeigen in dieser Region den größten Polymorphismus (der für die Bindung einer Vielzahl verschiedener Antigenpeptide notwendig zu sein scheint). Schließlich konnte in dieser Furche bei der Kristallisation ein gebundenes Molekül unbekannten Ursprungs entdeckt werden, so daß auch Klasse I-restringierte T-Zellen Fremd-Antigene aller Wahrscheinlichkeit nach als prozessierte Peptide erkennen, die an das MHC-Molekül gebunden sind (Bjorkman et al., 1987b).

Neben der MHC-restringierten Erkennung von viralen Proteinen sind CTL auch für die eingangs erwähnte Abstoßung von Transplantaten verantwortlich. Die Erkennung von Zellen, die nicht die auf der Effektorzelle exprimierten Histokompatibilitätsantigene (=Alloantigene) tragen, führt zur Aktivierung und Expansion von T-Zell-Klonen, die spezifisch gegen bestimmte Bereiche (=Epitope) der MHC-Antigene der "fremden" Zelle gerichtet sind (Cowan et al., 1985; McLaughlin-Taylor, 1984) und im weiteren zur Lyse dieser Zelle.

"Antigen Mimikry"

Lange Zeit stellte die in der Natur kaum "benötigte" Alloreaktion viele Immunologen vor Rätsel. *In-vivo* wie *in-vitro* Experimente zeigten einen erstaunlich hohen Anteil an Vorläufer-Zellen, deren Rezeptoren für Alloantigene spezifisch sind (Ryser und McDonald, 1979; Ford et al., 1975). Eine viel diskutierte Frage war dabei, ob alloreaktive CTL und solche, die Fremdanitigen im Zusammenhang mit Selbst-MHC erkennen, verschiedene Subpopulationen innerhalb des T-Zell-Repertoires darstellen oder ob vielmehr ein Zelltyp beide Strukturen erkennen kann.

Erste Untersuchungen wurden im Mäusesystem durchgeführt und zeigten, daß einzelne T-Zellklone nicht nur Selbst-MHC + Fremd-Antigen sondern gleichzeitig auch Allo-MHC-Antigen erkennen können (von Boehmer et al., 1979; Bevan et al., 1977). Untersuchungen der Spezifität von zytotoxischen Zellen, die gegen EBV- (Epstein-Barr-Virus) Antigene auf menschlichen B-Zellen gerichtet sind, zeigten eine Klasse I-restringierte Erkennung. Jedoch wurden in Einzelfällen auch B-Zellen mit "unverträglichen" HLA-Antigenen lysiert, unabhängig von ihrer Infektion mit EBV. Die so gefundene Alloreaktivität konnte mit monoklonalen Antikörpern inhibiert werden (Gaston et al., 1983).

EBV-spezifische zytotoxische T-Zellen scheinen ein kurzes Peptidstück des p63/latent Membranproteins (Thorley-Lawson und Israelsohn, 1987) oder des Nukleären Antigens 2 (EBNA 2, Moss et al., 1988) des Epstein-Barr-Virus zusammen mit eigenen HLA-Antigenen zu erkennen.

Einige solcher CTL, die sowohl virusinfizierte Zellen als auch solche mit allogenen MHC-Produkten lysieren, haben die zwei HLA-Antigene B35 und B44 oder ein mit ihnen in engem Kopplungsungleichgewicht stehendes Produkt als Zielantigen (Gaston et al., 1983; D. Schendel, Manuskript eingereicht).

Erst vor kurzem wurden Homologien der DNA-Sequenz des Cytomegalovirus (CMV) und Klasse I-Genen festgestellt (Beck und Barrell, 1988). Dieses "Antigen-Mimikry" könnte auch Ursache für die Kreuzreaktion von CTL zwischen Virus- (+Selbst-MHC) und Alloantigenen sein. In klinischen Studien wurde beobachtet, daß Patienten, die eine starke Immunantwort gegen CMV zeigten, auch Organtransplantate häufiger abstießen, während bei "erfolgreichen" Transplantationen (d.h. keine Abstoßungsreaktion) die Gefahr einer Infektion mit CMV oder anderen opportunistischen Keimen sehr groß ist (Simmons et al., 1974).

HLA und Krankheiten

Seit langem ist auch eine Assoziation von bestimmten HLA-Antigenen mit Krankheiten bekannt. Eine der ersten Untersuchungen betraf das 100fach erhöhte Risiko von HLA B27-Trägern, an ankylosierender Spondylitis (einer Gelenkveränderung) zu erkranken (Schlosstein et al., 1973; Brewerton et al., 1973). Bis heute ist diese stärkste bisher beobachtete Assoziation zwischen HLA-Antigen und Krankheit Gegenstand intensiver Forschungen. Weitere Beispiele solcher Assoziationen sind die chronisch aktive Hepatitis bei Trägern von Hepatitis B-Virus (Mota et al., 1987) und die Subakute Thyreoiditis vom Typ de Quervain (Nyulassy et al., 1975) mit HLA B35. Bisher gibt es erst hypothetische Modelle für die Entstehung und den funktionellen Zusammenhang zwischen Krankheit und dem MHC, wobei das vorher erwähnte "Antigen Mimikry" auch hier eine Rolle spielen könnte. Experimentelle Beweise hierfür stehen jedoch noch aus.

Kopplungsungleichgewicht mit anderen MHC-Produkten

Innerhalb des HLA- bzw. des H-2-Komplexes stehen insbesondere Allele der Klasse III, aber auch der Klasse II und I in engem Kopplungsungleichgewicht zueinander, d. h. es besteht eine hohe Differenz Δ zwischen der Verteilung der Allele entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz und der tatsächlich beobachteten Häufigkeit der Allelkombination. Bestimmte Kombinationen der Komplementgene für C4, C2 und Bf werden scheinbar als genetisch stabile Einheiten, sogenannten Komplotypen mit seltenen Crossing-over-Ereignissen weitervererbt, was durch umfangreiche Familienanalysen gezeigt werden kann (Alper et al., 1981). Auch innerhalb der Klasse I (z.B. A1 und B8 oder B35 und Cw4), aber auch zwischen Klasse I- und Klasse II-Allelen (B8-DR3, B7-DR2) sowie zwischen Klasse I und Klasse III (B8 mit dem Komplotyp 10SC; C4B=1, C4A=0, Bf=S, C2=C; Alper et al., 1981 oder zwischen B35 und C4A 3/2; Schendel et al., 1984a) bestehen hohe Kopplungsungleichgewichte (Terasaki, 1980). Bei einer bestimmten Kombination der

Allele für HLA-B, HLA-DR und den Komplementkomponenten C4A, C4B, Bf und C2 spricht man von einem "Extended Haplotype" (Alper et al., 1983). Ursache dieser Kopplungsungleichgewichte ist möglicherweise eine natürliche Selektion für oder gegen eine spezifische Genkombination (Bodmer und Bodmer, 1978). Jedoch könnte es sich auch um einen Übergangszustand zwischen der Entstehung des hohen MHC-Polymorphismus und dem Endzustand des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts handeln, in dem Δ den Wert null erreicht. Bei enggekoppelten Genen, wie sie in der HLA-Region vorkommen, wird dieser Zustand nur sehr langsam angenähert.

Analyse von HLA-Antigenvarianten

Die Charakterisierung des hohen Polymorphismus von Klasse I-Loci und deren Proteinprodukten wurde durch die Entwicklung verschiedener Analysemethoden möglich gemacht.

(1) HLA-Serologie: Mit Hilfe von Antisera gegen bestimmte HLA-Genprodukte gelang es bisher, 22 unterschiedliche HLA A-Antigene, 47 B- und 8 C-Antigene zu definieren (Daten des 9. Internationalen Histokompatibilitäts-Workshops aus "Histokompatibility Testing 1984").

(2) Untersuchung durch Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) und Sequenzierung von HLA-Genen: Die zuverlässigste Aussage über den Polymorphismus innerhalb der HLA-Region läßt sich durch Analyse der kodierenden Gene treffen.

Mit einer spezifischen Restriktionsendonuklease wird die DNA einer definierten Zelle in Fragmente zerschnitten, die elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine geeignete Membran transferiert werden. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-"Probe" eines definierten Gens lassen sich die für Restriktionsenzym und DNA-Sequenz (und damit auch für ein bestimmtes Allel) spezifischen Muster sichtbar machen. Während eine ganze Reihe von Klasse II-Allele durch RFLP gut

charakterisiert sind (Review von Bidwell, 1988), fehlt es bei Klasse I-Genen noch an zuverlässigen Daten.

Weitere Aufschlüsse über den Ort und das Ausmaß von Mutationen liefert die Sequenzierung einzelner HLA-Gene. So sind bisher sieben A-Lokus-Gene, elf B-Lokus-Gene und drei C-Lokus-Gene sequenziert (Parham, 1987; Zemmour et al., 1988; Güssow et al., 1987). Die größte Variabilität zeigt dabei die α_1 -Region zwischen den Aminosäureresten 62-82 (Parham, 1987).

(3) Zelluläre Klassifikation: Bestimmte serologisch einheitliche Klasse I-Antigene können durch Generierung von zytotoxischen T-Zellen, die spezifische Subtypen erkennen, besser analysiert und weiter subklassifiziert werden. In einer gemischten Lymphocytenkultur zweier bezüglich eines HLA-Allels unterschiedlicher Zellpopulationen werden CTL aktiviert, die gegen das "fremde" Antigen gerichtet sind. Eine "einseitige" Antwort der "Effektorzellen" erhält man dann, wenn die zweite Population der "Stimulatorzellen" bestrahlt wird. Nach sechstägiger Stimulation kann die Reaktion der so erhaltenen CTL mit Trägern definierter HLA-Antigene getestet werden. Die Freisetzungsrates von radioaktivem Chrom (^{51}Cr), mit dem die "Zielzellen" vorher markiert werden, ist ein Maß für die Erkennung des Antigens durch die CTL (Schendel et al., 1984c).

Bei folgenden serologisch einheitlichen HLA-Antigenen konnten durch CTL Subtypen entdeckt werden: A2 (Biddison et al., 1980), A3 (Biddison et al., 1981), B7 (Spits et al., 1982), B27 (Breuning et al., 1982), B35 (Breuning et al., 1984) und B44 (Tekolf et al., 1982).

(4) Isoelektrofokussierung (IEF): Das Prinzip der IEF beruht auf der Verwendung einer Mischung von amphiphilen Puffersubstanzen, sogenannten Trägerampholyten, durch die innerhalb einer Gelmatrix bei Anlegung eines elektrischen Feldes ein pH-Gradient aufgebaut wird. In

diesem Gradienten wandern Proteine, bis sie sich an ihrem isoelektrischen Punkt (pI) sammeln, an dem die Nettoladung des entsprechenden Moleküls den Wert null erreicht (Svensson et al., 1961).

Die anfänglich meist verwendete 2 D-Gelelektrophorese, bei der Proteinantigene nach Größe und isoelektrischen Punkt aufgetrennt wurden, ermöglichte die Analyse von serologisch nicht erkennbaren Ladungsheterogenitäten bei Klasse I-Antigenen (Parham et al., 1974; Biddison et al., 1980, 1982; Kaneoka et al., 1983). Diese Methode beinhaltet jedoch folgende Nachteile:

- geringe Effektivität (pro 2 D-Gel kann jeweils nur eine Probe analysiert werden)
- begrenzte Reproduzierbarkeit (Variation des pH-Gradienten sowie Unterschiede in den Laufzeiten bedingen Unterschiede im Proteinmuster zwischen verschiedenen Gelen) und daher
- begrenzte Vergleichsmöglichkeit zu Parallelproben

Die Entwicklung von eindimensionalen IEF-Gelen zur Analyse von HLA-Antigenen, die erstmals von van der Poel et al. (1983) und Yang et al. (1984) publiziert wurden, erlaubt die Analyse vieler Proben auf einem Gel und damit eine verbesserte Vergleichsmöglichkeit zwischen verschiedenen Proben.

Der IEF der Proteinketten entsprechend ihres pI geht eine Immunpräzipitation der Antigene aus dem Zelllysat voraus. Die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (mAb) gegen ein bei allen Klasse I-Antigenen vorhandenes Epitop (in dieser Studie wurde der mAb W6/32 verwendet) bietet dabei die Möglichkeit, den Polymorphismus verschiedener Loci zu untersuchen, ohne die Voraussetzung, spezifische Reagenzien zu besitzen. Eine biosynthetische Markierung der Proteine (mit ^{35}S -Methionin) gewährleistet dabei eine hohe Empfindlichkeit bei geringer Probenmenge.

Mit Hilfe dieser Methode können Analysen von HLA-Antigenen und deren Subtypen durchgeführt werden, ohne ein geeignetes Zellpanel zur Generierung von HLA-spezifischen CTL zu besitzen, wie das für die zelluläre Typisierung notwendig ist.

Aufgabenstellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Subtypen von serologisch einheitlichen HLA-Antigenen, die durch zelluläre Typisierung definiert wurden, auch in Differenzen ihres isoelektrischen Punktes widerspiegeln. Als Beispiel hierfür dienten die beiden Antigene B35 und B44, die durch verschiedene CTL gut charakterisiert sind.

In früheren Studien wurden außerdem CTL generiert, die eine Kreuzreaktion mit einem Epitop eines EBV-Proteins auf infizierten Zellen einerseits und einer Determinante auf B35- oder B44- tragenden Zellen andererseits zeigen. Dieses Reaktionsmuster ist charakteristisch für ein "Antigen Mimikry" zwischen Alloantigenen und Selbst-MHC + Fremdanitigen. Durch Isoelektrofokussierung sollte untersucht werden, ob die durch diese CTL erkannte Determinante eine subtypspezifische Struktur der Alloantigene B35 oder B44 darstellt. Das Ergebnis könnte Aufschluß darüber geben, ob diese zytotoxischen Zellen das HLA-Antigen als solches oder ein damit in Kopplungsungleichgewicht stehendes Antigen erkennen.

Genauere Aufschlüsse über die MHC-Restriktion dieser CTL bei der Fremdanitigenerkennung sollten IEF-Untersuchungen der HLA-Antigene der Effektorzelle geben.

Da auf diesem "Antigen Mimikry" auch die Assoziation verschiedener Krankheiten mit bestimmten HLA-Antigenen beruhen könnte, wurde die Abhängigkeit einer B35-assoziierten Krankheit mit Subtypen dieses Antigens untersucht.

Durch Analyse möglicher Kopplungsungleichgewichte bei B35- und B44-Subtypen sollten schließlich Aufschlüsse über die Phylogenie dieser beiden HLA-Antigene gewonnen werden.

MATERIAL UND METHODENReagenzien*Zellkultur:*

Plastikmaterial:	Costar, Fernwald und Falcon, Becton & Dickinson, Heidelberg
RPMI 1640-Medium:	Biochrom, Berlin
Methioninfreies Medium:	Biochrom, Berlin
L-Glutamin:	Gibco, Karlsruhe
Penicillin, Streptomycin:	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat:	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS):	Gibco, Karlsruhe
Clex:	Dextran Products, Scarborough (Kanada)
Phythämagglutinin (PHA):	Difco, Detroit (USA)
³⁵ S-Methionin:	Amersham, Braunschweig

Biochemische und serologische Analysen:

Natrium-Taurocholat:	Sigma, München
Triton X-114:	Sigma, München
Nonidet P-40:	Sigma, München
PMSF (Phenylmethyl- sulfonylfluorid):	Sigma, München
Benzamidin:	Sigma, München
Trasylol	Bayer, Leverkusen
3'3'Dithiobis(Propionsäure- N-Hydroxysuccinimidester)	Sigma, München
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia-LKB, Freiburg
Staphylococcus aureus	zur Verfügung gestellt
Zellen, Stamm Cowan I	von Dr. Ploegh, Amsterdam
	Kommerziell erhältlich bei
	Calbiochem, Frankfurt
	(Pansorbin Cells)

Neuraminidasen

aus <i>Vibrio cholerae</i> :	Behringwerke, Marburg
aus <i>Cl. perfringens</i> (Typ VI, Typ VIII):	Sigma, München
Acrylamid:	Bio-Rad, München
Bis-Acrylamid:	Serva, Heidelberg
Harnstoff:	Bio-Rad, München
Natrium-Dodecylsulfat (SDS):	Bio-Rad, München
Tris	Sigma, München
Ampholine®	Pharmacia-LKB, Freiburg
Ammoniumpersulfat:	Bio-Rad, München
TEMED (N,N,N',N'-Tetra- methylethylendiamin)	Sigma, München
Bromphenolblau:	Sigma, München
Amplify:	Amersham, Braunschweig
Coomassie Blau R 250	Sigma, München

Alle übrigen hier nicht erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Häufig verwendete Medien und Puffer

Zellkulturmedium für B-LCL:

RPMI 1640-Medium mit

2 mM	L-Glutamin
100 E/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
1 mM	Pyruvat
5% (v/v)	Fötales Kälberserum (FCS)

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung):

75 mM NaCl	
75 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	
9 mM KH ₂ PO ₄	pH = 7,2

Waschlösungen für Immunpräzipitate:

Lösung A: 50 mM Tris-HCl, pH = 8,2
 1 mM EDTA
 500 mM NaCl
 0,5% (w/v) Natrium-Taurocholat

Lösung B: 50 mM Tris-HCl, pH = 8,2
 150 mM NaCl
 0,5% (w/v) Natrium-Taurocholat
 0,1% (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS)

Lösung C: 50 mM Tris-HCl, pH = 8,2
 150 mM NaCl
 0,5% (w/v) Natrium-Taurocholat

NET-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4
 5 mM EDTA
 150 mM NaCl
 0,5% (v/v) Nonidet P-40

Neuraminidase-Puffer:

50 mM Natriumacetat, pH = 5,8
 1 mM CaCl_2

Probenpuffer für SDS-PAGE:

125 mM Tris-HCl, pH = 6,8
 4% (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS)
 1% (v/v) β -Mercaptoethanol
 2% (v/v) Glycerin

Elektrodenpuffer für die SDS-PAGE:

50 mM Tris
 400 mM Glycin
 0,1% (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS)

Probenpuffer für die IEF:

9,5 M	Harnstoff
5% (v/v)	β -Mercaptoethanol
2% (v/v)	Nonidet P-40
2% (v/v)	Ampholine ^R 3,5-10

FACSCAN-Zytometer und	Becton & Dickinson,
Facscan-Analyseprogram:	Heidelberg
Spannungsgerät 2197	Pharmacia-LKB, Freiburg
Elektrophoresekammer,	Werkstatt des Instituts
Abstandhalter, Kämme:	für Immunologie
Whatman 3MM Papier:	Herolab, St. Leon Rot

Fotomaterialien:

Röntgenfilm X Ray 90:	Linhart, München
Filmkassetten	
(Agfa Gevaert):	Linhart, München

Verwendete Antikörper:

W6/32:	Anti-HLA Klasse I (Parham, 1979)
L243:	Anti HLA DR β I + III (Lampson und Levy, 1980)
L227:	Anti HLA DR β III (Lampson und Levy, 1980)
141/11	Anti H-2 (zur Verfügung ge- stellt von G. Wildner, München)
MUC BA 18.1	Anti-Melanom (zur Verfügung gestellt von J. Johnson, München)
anti-Maus-IgG	Sigma, München
anti-Maus-Ig,	
FITC-konjugiert	Dakopatts, Hamburg

Verwendete Zellen

Mit Ausnahme der Zelllinien O133, 1022, 1171, 1581 und 2181, die von B. Breur-Vriesendorp, Amsterdam zur Verfügung gestellt wurden sowie den Lymphocyten aus Blutspendern mit Subakuter Thyreoiditis (zur Verfügung gestellt von Sasazuki, Japan) stammen alle verwendeten Zellen aus dem Blutspenderpanel des Labors von Prof. Schendel und Dr. Wank und wurden freundlicherweise im Labor von Dr. Wank serologisch typisiert.

Verwendete Methoden

Gewinnung von PHA-Blasten

Periphere Blutlymphocyten werden in RPMI 1640-Medium, das 15% Humanserum enthält, aufgenommen. Phythäm-agglutinin (PHA) wird in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt. Dieses Lektin stimuliert vor allem T-Lymphocyten polyklonal, bei der weiteren Kultur kommt es jedoch auch zu einer Vermehrung von B-Zellen. Nach drei bis vier Tagen Kulturzeit sind die stimulierten Zellen maximal aktiv und können für HLA-Analysen verwendet werden.

Die Kultur von B-LCL erfolgt ebenso wie die Stimulation von PHA-Blasten bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂.

Radioaktive Markierung von Zellen

PHA-Blasten oder B-LCL werden abzentrifugiert und in methioninfreiem Medium aufgenommen (RPMI 1640-Medium mit den entsprechenden Zusätzen des Zellkulturmediums; bei der Markierung von PHA-Blasten werden zusätzlich

10 U rekombinantes IL-2/ml zugegeben). Die weitere Kultur erfolgt in 24-Well-Platten bei einer Konzentration von $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C werden 25 μ Ci 35 S-Methionin/Well zupipettiert und weitere 6 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640-Medium +5% FCS können die Zellen lysiert werden.

Zellyse

Um genügend kleine Membranfragmente für die Immunpräzipitation zu erhalten, müssen die radioaktiv markierten Zellen lysiert werden. Nach dem Waschen wird das Zellpellet, das $5 \cdot 10^6$ Zellen enthält, mit 1 ml Lysepuffer (1% (w/v) Taurocholat in PBS) versetzt. Durch Zusatz der Proteaseinhibitoren PMSF (20 μ l einer 200mM Stammlösung in Ethanol), Benzamidin (20 μ l einer 100mM Stammlösung in Ethanol) und Trasylol (40 μ l) werden autolytische Prozesse unterbunden. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4°C werden unlösliche Bestandteile des Zellkerns und des Zytoskeletts bei 15.000-g 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand enthält die löslichen Membranantigene.

Das Zellysat wird zunächst zur Beseitigung von Immunglobulin und anderen unspezifisch an Protein A-Sepharose bindenden Substanzen über Nacht mit 40 μ l einer 50%igen (v/v) Protein A-Sepharose-Suspension bei 4°C unter ständigem Rollen des Reaktionsgefäßes inkubiert. Die spezifische Immunpräzipitation mit dem Matrix-gekoppelten monoklonalen Antikörper erfolgt über 3 h bei 4°C.

Bei der sequentiellen Immunpräzipitation wird zwischen den einzelnen Präzipitationsschritten mit unterschiedlichen Antikörpern eine kurze (30 min.) Behandlung mit Protein A-Sepharose eingeschoben.

Das Sepharose-Pellet mit dem gebundenen Antigen wird anschließend zweimal mit Puffer A, zweimal mit Puffer B und zweimal mit Puffer C gewaschen, wobei dem letzten Waschgang ein Wechsel des Reaktionsgefäßes vorausgeht.

SDS-PAGE (Lämmli, 1970)

Das unlösliche Präzipitat wird in 80 µl Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand auf das Vertikalgel aufgetragen, das sich wie folgt zusammensetzt:

Trenngel (12,5%):	14,58 ml	30% (w/v) Acrylamid/ 0,8% (w/v) Bis-Acrylamid
	8,75 ml	1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8
	11,15 ml	H ₂ O dest.
	0,4 ml	10% (w/v) SDS
	0,1 ml	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
	0,02 ml	TEMED

Sammelgel:	1,0 ml	30% Acrylamid/ 0,8% Bis-Acrylamid
	2,5 ml	0,5M Tris-HCl, pH = 6,8
	6,3 ml	H ₂ O dest.
	0,1 ml	10% SDS
	0,1 ml	10% Ammoniumpersulfat
	0,005ml	TEMED

Maße des Gels: 140 x 160 x 1,5 mm

Der Kamm (für 12 Proben) besteht aus Teflon, die Abstandhalter aus Plexiglas;

Die Elektrophorese wird über eine Dauer von 16 h bei einer Spannung von 50 V durchgeführt, die gegen Ende des Laufs auf 100 V erhöht wird. Anschließend wird das Gel 10 min. mit Coomassie-Blau (Gelfixierlösung + 0,2% (w/v) Coomassie Blau R 250) gefärbt und dann ca. 2 h mit Fixierlösung (30% Methanol, 7% Eisessig in H₂O) unter mehrfachem Wechsel entfärbt.

Für die Fluorographie wird das Gel 30 min. in Amplify inkubiert, danach auf Whatman 3MM-Papier getrocknet und drei bis vier Tage bei -70°C mit einem Röntgenfilm exponiert.

Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose

Etwa 1 g lyophilisierte Protein A-Sepharose wird in 15 ml PBS suspendiert und über Nacht gerollt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird die Suspension auf 50% (v/v) Sepharosegehalt eingestellt und 0,01% (w/v) Natriumazid zur Verhinderung von Bakterien- und Pilzwachstum zugegeben. Für die Kopplung des monoklonalen Antikörpers werden Ascitis-Präparation und Protein A-Sepharose im Verhältnis 1:10 gemischt und über Nacht gerollt. Bei Verwendung von Überstand beträgt das Verhältnis von Antikörper zu Protein A-Sepharose (50%) etwa 125:1.

Anschließend wird wiederum dreimal mit PBS gewaschen und auf eine Endkonzentration von 50% Sepharose eingestellt.

Bei monoklonalen Antikörpern, bei denen eine direkte Bindung an Protein A-Sepharose nicht möglich ist, wird die Protein A-Sepharose zunächst mit einem anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelt (im Verhältnis 10:1). Der monoklonale Antikörper wird anschließend an das Konjugat gebunden.

Präparation von fixierten Staphylococcus aureus Zellen

Aus einer bei -70°C aufbewahrten Glycerinsuspension wird eine Nährlösung angeimpft, die sich wie folgt zusammensetzt:

17,5 g Antibiotic Medium
5,0 g Hefeextrakt
5,0 g Casein Hydrolysat
5,0 g β -Glycerophosphat

10 mg Thiamin-HCl
10 mg Nicotinsäure
(sterilfiltriert)

H₂O ad 1 l

Anzuchtzeit: 14-16 h auf einem Schüttler bei 300 rpm
und 37°C

Nach der Zellernte (5000·g, 10 min) wird das Pellet gründlich in PBS suspendiert und anschließend ein zweites Mal mit PBS gewaschen.

Zu dieser Zellsuspension wird unter ständigem Rühren tropfenweise eine 37%ige Lösung von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1,5 % zugegeben und anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach weiterem Waschen mit PBS wird die PBS-Suspension für 7 min. in einem Wasserbad bei 80°C erhitzt und danach sofort durch Eiskühlung wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt eine zweite Fixierung der Zellen mit Formaldehyd (hierbei sind 30 min. Inkubationszeit ausreichend). Danach werden die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und der Überstand sorgfältig zur Entfernung von letzten Formaldehydresten abgesaugt.

Um eine homogene Suspension zu erhalten, können die Zellen mit einem Dounce Homogenisierer behandelt werden.

Aliquots dieser Suspension (eine Konzentration von 10 % ist gebräuchlich) können bei -70°C aufbewahrt werden.

Neuraminidase-Behandlung

Bei der Isoelektrofokussierung erfolgt zwischen Präzipitation und Gelauftrag der Proben eine Behandlung mit Neuraminidase. Die Präzipitation wird wie bei der SDS-PAGE durchgeführt, jedoch erfolgt in diesem Fall der letzte Waschschrift mit NET-Puffer. Die Proben werden danach in 20 µl Neuraminidase-Puffer aufgenommen und 50 µl *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase hinzugefügt. Unter ständigem Drehen bei 37°C werden während 3 h die Neuraminsäurereste abgespalten.

Isoelektrofokussierung

Zusammensetzung des Gels:

13,75 g	Harnstoff
3,75ml	30% Acrylamid/ 1,6% Bis-Acrylamid
5,0 ml	10% (v/v) Nonidet P-40
5,5 ml	H ₂ O dest.

Diese Mischung wird bei 37°C geschüttelt, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hat. Danach werden die weiteren Bestandteile zugegeben:

0,25ml	Ampholine 3,5 - 10
1,0 ml	Ampholine 5 - 7
0,1 ml	Ampholine 7 - 9
0,1 ml	10% Ammoniumpersulfat
0,05ml	TEMED

Der Kamm wird zur besseren Polymerisation mit 10% Ammoniumpersulfat benetzt.

Maße des Gels: 180 x 160 x 0,75 mm

Die Abdichtung der Glasplatten sowie des Raums zwischen den Glasplatten und den Puffertanks erfolgt mit 1,5 % (w/v) Agarose, wobei besonders darauf zu achten ist, daß keine Pufferbrücke zwischen oberer und unterer Elektrodenkammer entsteht, die das elektrische Feld innerhalb des Gels stört.

Für die IEF werden die desialysierten Proben abzentrifugiert und das Pellet in IEF-Probenpuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand mit einer Hamiltonspritze auf das Gel aufgetragen, wobei die Spritze nach jedem Probenauftrag mit Wasser und Probenpuffer gespült wird.

Die Proben werden anschließend mit Overlay-Puffer (= Probenpuffer unter Zusatz von etwas Bromphenolblau 1:2 mit H₂O verdünnt) überschichtet, der eine Protein-deaminierung durch die Natronlauge im oberen Puffertank verhindert.

Danach wird der untere Puffertank mit 20mM H₃PO₄ gefüllt, der obere mit 50mM NaOH, die vorher entgast wurde.

Die Fokussierung erfolgt bei Raumtemperatur und limitierter Leistung bei einer Anfangsspannung von 400 V und einer Höchstspannung von 1000 V, die innerhalb von ca. 2h erreicht wird. Die Fokussierungsdauer beträgt 12 - 16h. Das Gel wird anschließend 30 Minuten fixiert, 30 Minuten in Amplify-Lösung inkubiert und dann 2-3 Tage bei -70°C exponiert.

Immunpräzipitation mittels Crosslinking

Die Zellen werden bei dieser Präzipitationsmethode wie üblich 6 h markiert. Nach dem Waschen werden sie in 1 ml PBS-Puffer, der mit NaOH auf pH = 8,3 eingestellt ist, aufgenommen.

Zu dieser Zellsuspension werden 7,5 µl des monoklonalen Antikörpers (Ascitis-Präparation) gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C kommen 10 µl des Crosslinkers (3'3'-Dithiobis(Propionsäure-N-Hydroxy-succinimidester)) aus einer Stammlösung von 5 mg/ml in DMSO zur Probe, die 1h bei Raumtemperatur inkubiert wird. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen 10 Minuten in 1 ml 20mM Tris-HCl Puffer, pH = 8,3 inkubiert und anschließend mit 1% Taurocholat lysiert. Die Präzipitation mit Protein A-Sepharose erfolgt ohne vorheriges Preclearing.

Indirekte Immunfluoreszenz

$1-2 \cdot 10^5$ Zellen werden bei 3000·g 3 min. abzentrifugiert und mit PBS, das 10% Clex enthält, gewaschen. Nach Aufschütteln des Pellets werden 50 μ l des monoklonalen Antikörpers (Überstand) zugegeben und 60 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wird wiederum zweimal mit PBS-Clex gewaschen und 50 μ l des FITC-markierten anti-Immunglobulin-Antikörpers hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min. werden die Zellen erneut zweimal mit PBS-Clex gewaschen und in 200 μ l PBS mit 1% (w/v) Paraformaldehyd aufgenommen.

Nach Zugabe des FITC-markierten Antikörpers sollen die Zellen nach Möglichkeit im Dunkeln inkubiert werden, um eine vorzeitige Zersetzung des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

Die auf diese Weise markierten Zellen können mittels eines Zytometers analysiert werden.

ERGEBNISSE

1. Parameter für die biochemische Analyse von HLA-Klasse I-Proteinen

Verwendete Zellen

Um HLA Klasse I-Antigene eines umfangreichen Panels von Blutspendern zu analysieren, wurden Zellen verwendet, die sich ohne große Probleme in Kultur halten ließen und innerhalb kurzer Zeit eine hohe Zellausbeute gewährleisten.

Diese Bedingungen werden einerseits durch B-Lymphocyten erfüllt, die durch Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisiert wurden (B-LCL) und auf der anderen Seite durch periphere Blutlymphocyten (PBL), die durch das Lektin Phythämagglutinin (PHA) stimuliert wurden.

Für eine Analyse durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) oder eindimensionale Isoelektrofokussierung (1 D-IEF) wurden jeweils etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen als Ausgangsmaterial eingesetzt. Beide Zelltypen ergaben bei Immunpräzipitation etwa gleiche Ausbeuten an Antigen.

Abbildung 3 zeigt das Autoradiogramm einer Isoelektrofokussierung mit fünf EBV-transformierten B-Zelllinien (LET, O133, 1022, 1171 und SCD) sowie die Analyse von PHA-stimulierten PBL mit der Nummer 2181. Wie hier, so konnten auch bei anderen Fokussierungen keine Unterschiede bei der Analyse der Gele zwischen beiden Zelltypen festgestellt werden.

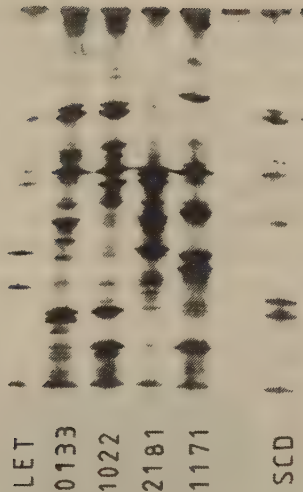


Abbildung 3: Isoelektrofokussierung von B-LCL und PHA-Blasten

LET: B-LCL; 0133: B-LCL; 1022: B-LCL
 2181: PHA-B1. 1171: B-LCL; SCD: B-LCL

Radioaktive Markierung der Zellen

Um eine optimale Markierung von HLA-Antigenen zu erzielen, mußten Parameter gefunden werden, die eine effektive und gleichmäßige Aufnahme der Radioaktivität in alle betreffenden Proteine gewährleisten.

Zum Zweck der biosynthetischen Markierung der Antigene wurde hierbei ^{35}S -Methionin eingesetzt.

In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse zweier SDS-PAGE-Läufe dargestellt. Beide Male wurden Präzipitate der B-LCL SCD aufgetragen, die mit dem HLA Klasse I-spezifischen monoklonalen Antikörper W6/32 erhalten wurden. Jedesmal wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen zur Analyse eingesetzt, die mit insgesamt 100 μCi ^{35}S -Methionin markiert wurden. In der Abbildung 4 (III) wurde die Markierung in

24-Well-Platten bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml RPMI 1640-Medium durchgeführt, während bei der Abbildung 4 (II) je $25 \mu\text{Ci}$ ^{35}S -Methionin zu je $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium zugegeben wurde. Wie zu sehen ist, läßt sich durch eine erniedrigte Zellkonzentration eine deutliche Steigerung der effektiven Markierung der betreffenden Proteine erzielen, da bei dieser Konzentration der Metabolismus bezüglich sekundärer Stoffwechselprodukte wie dieser Oberflächenantigene maximal aktiv zu sein scheint.

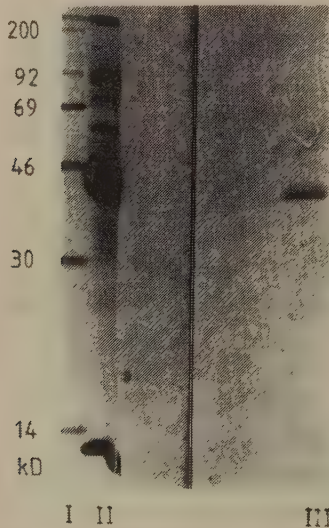


Abbildung 4: SDS-PAGE von SCD B-LCL, präzipitiert mit W6/32;
Abhängigkeit der Markierungseffizienz von der Zellkonzentration;

I: Molekulargewichtsmarker
II: 4 mal $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml, markiert mit je $25 \mu\text{Ci}$ ^{35}S -Methionin;
III: $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, markiert mit $100 \mu\text{Ci}$ ^{35}S -Methionin;
Markierungszeit: 24 h;
Expositionszeit: II: 24 h; III: 20 h;

Die optimale Markierungszeit ist ein wichtiger Faktor, der von der Halbwertszeit des betrachteten Proteins abhängt. Wie in Abbildung 5A und 5B zu sehen, unterscheiden sich die optimalen Zeiten für die Markierung von Klasse I- und Klasse II-Proteinen. Für Klasse I-Produkte erwiesen sich 6 h als am besten, während bei Klasse II-Antigenen längere Markierungszeiten von 15 - 21 h die besten Ergebnisse zeigten.

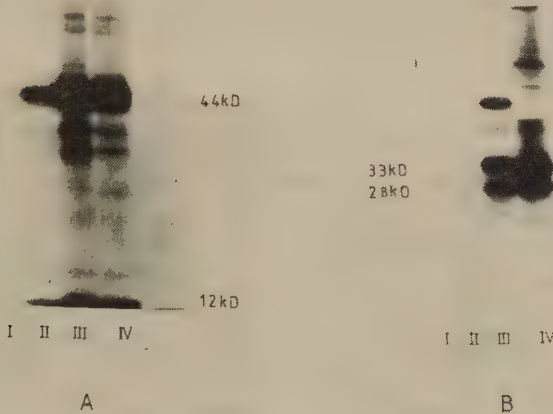


Abbildung 5: SDS-PAGE von Präzipitaten aus SCA B-LCL mit unterschiedlichen Markierungszeiten:

A) Präzipitation mit W6/32

B) Präzipitation mit L243

Markierung mit ^{35}S -Methionin:

I: 15 min II: 1 h III: 6 h IV: 21 h

Expositionszeit: 11 d

Detergentien für die Lyse der Zellen

Für die Studien an membranständigen Antigenen mußte das geeignete Detergens gefunden werden, um einen hohen Anteil dieser Proteine aus der Membran heraus in Lösung zu bringen, ohne sie jedoch schon vor der Präzipitation zu denaturieren. Dazu wurden Vergleiche zwischen den nichtionischen Detergentien Nonidet P-40 und

Triton X-114, dem zwitterionischen CHAPSO sowie dem anionischen Natrium-Taurocholat angestellt.

Abbildung 6A zeigt eine SDS-PAGE von DR-Präzipitaten der Zelle SCD, die mit unterschiedlichen Detergentien lysiert wurde. Während aus CHAPSO- und Taurocholat-Lysaten etwa gleiche Mengen an Antigen präzipitiert werden, ist die Menge an DR-Antigen im NP-40-Lysat bei gleichen Präzipitationszeiten deutlich niedriger. Auch bei der Analyse von Klasse I-Antigenen sind die Ausbeuten aus CHAPSO- und Taurocholat- lysierten Zellen in etwa gleich, wie Abbildung 6B beweist.

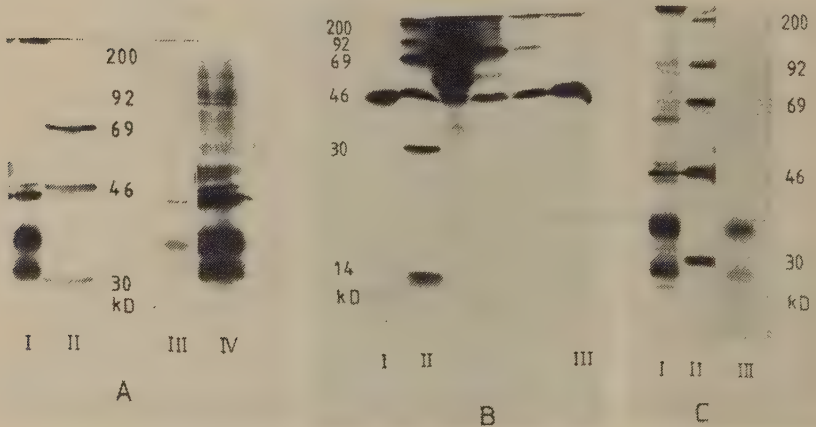


Abbildung 6: SDS-PAGE mit verschiedenen Detergentien bei der Lyse der Zellen:

- A) SCD B-LCL, präzipitiert mit L243;
 I: CHAPSO II: MW-Marker III: NP-40 IV: Na-Taurocholat
 B) JÄV B-LCL, präzipitiert mit W6/32
 I: CHAPSO II: MW-Marker III: Na-Taurocholat
 C) LEM B-LCL, präzipitiert mit L243
 I: Na-Taurocholat II: MW-Marker III: Triton X-114

Eine Möglichkeit der Konzentrierung von Membranantigenen in geringen Volumina bietet die Lyse mit Triton X-114. Die Solubilisierung der Proteine geschieht hierbei bei einer Temperatur von 0 - 4°C. Erwärmt man das Lysat nun auf 30 - 37°C, so läßt sich

eine Phasentrennung in eine hydrophile Phase, in der sich wasserlösliche Proteine sammeln, und eine hydrophobe Detergensphase mit den amphiphilen Membranproteinen durchführen. Insbesondere für Untersuchungen mittels Western Blotting scheint diese Methode sehr geeignet zu sein. Den Vorteil der Konzentrierung von Membranproteinen bei der Immunpräzipitation aus einem radioaktiv markierten Zellysat überwiegt jedoch der Nachteil einer verringerten Gesamtausbeute an HLA-Antigen (siehe Abbildung 6C).

Preclearing des Lysats

Bei der Analyse von Lymphocytenkulturen, insbesondere bei der Verwendung von B-LCL, wird man immer auf der Oberfläche und im Zytoplasma der zu markierenden Zellen Immunglobulin finden, das bei der Präzipitation unspezifisch bindet. Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern in Kombination mit Protein A-Sepharose oder Protein A tragenden Staphylococcus aureus Zellen können diese zelleigenen Immunglobuline mit ihrem F_c -Teil an Protein A binden und somit die Analyse beeinträchtigen. Durch eine Vorinkubation mit Protein A, gebunden an Sepharose bzw. Staphylococcus aureus Zellen (Stamm Cowan I) wurde dieses störende Immunglobulin entfernt.

Um unspezifische Protein-Protein-Interaktionen und damit störende Hintergrundbanden bei der Analyse zu verhindern, wurde dem Lysat bei der Vorinkubation mit Protein A, wie bei Vasilov et al. (1983) beschrieben, zunächst Kaninchenserum zugefügt, was zwar eine Verringerung des Hintergrundes bewirkt, jedoch gleichzeitig zu einem Verlust von einzelnen HLA-Antigen in der späteren spezifischen Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper führt (siehe Abbildung 7).

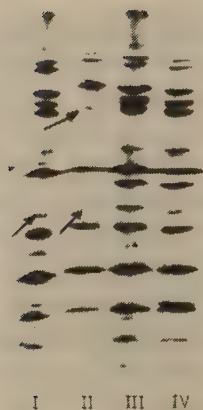


Abbildung 7: Einfluß der Matrix bei der Immunpräzipitation und Kaninchenserum beim Preclearing

I: Preclearing mit NRS; Matrix: Protein A-Sepharose;
 II: Preclearing mit NRS; Matrix: Staph. aureus Zellen;
 III: Preclearing ohne NRS; Matrix: Protein A-Sepharose;
 IV: Preclearing ohne NRS; Matrix: Staph. aureus Zellen;

↗ : Verlust von Banden

Möglicherweise können einzelne HLA-Antigene mit Kaninchenserum gebunden werden, die durch die Präzipitation aus dem Lysat entfernt werden und damit der spezifischen Antikörper-Antigenbindung verlorengehen.

Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern

Um die im Detergens löslichen Membranantigene an eine feste Matrix zu binden, gibt es mehrere Möglichkeiten:

a) Bindung des Antigens an den monoklonalen Antikörper und anschließende Kopplung des Immunkomplexes an die Matrix;

Die Ascitis-Präparation des monoklonalen Antikörpers wird dem Lysat direkt zugegeben und nach einer gewissen Inkubationszeit mit Protein A, das an die Oberfläche

von *Staphylococcus aureus* Zellen oder kovalent an Sepharose-Beads gekoppelt ist, präzipitiert. Protein A ist in der Lage, Maus-Immunglobulin der Subklassen IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und schwach IgG₁ zu binden, wobei der konstante F_c-Teil des Immunglobulins an das Molekül geknüpft wird. Bei der Präzipitation mit den Klasse I-spezifischen mAb W6/32 (IgG_{2a}) oder dem DR-bindenden mAb L243(IgG_{2a}) werden die Immunkomplexe somit direkt an die Matrix gebunden.

b) Vorherige Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Matrix und anschließende Immunpräzipitation;
Bei der Verwendung einer Ascitis-Präparation liegt der monoklonale Antikörper in einer hochkonzentrierten Form vor, die eine Bindung von Antigen als auch Protein A innerhalb kurzer Zeit ermöglicht. Verwendet man dagegen Überstand aus einer Zellkultur, so ist es notwendig, den monoklonalen Antikörper, der hier stark verdünnt vorliegt, zunächst über Protein A an die unlösliche Matrix zu koppeln. Der Komplex aus Antikörper, Protein A und Sepharose bzw. Bakterienzelle wird dann zur Präzipitation eingesetzt. Diese Technik kommt auch bei Antikörpern zur Anwendung, die nicht den oben erwähnten Ig-Klassen angehören. Dabei wird im ersten Schritt ein anti-Maus-Ig-Antikörper an Protein A gekoppelt und danach der spezifische Antikörper an das anti-Maus-Ig gebunden. Mehrere anti-Immunglobulin-Reagenzien wurden mit Ig_M- und IgG₁-monoklonalen Antikörpern getestet, wobei sich ein Kaninchen-anti-Maus IgG-Serum der Firma Sigma als das günstigste erwies.

Als feste Matrix, an die die Immunkomplexe gebunden sind, lassen sich die ganzen fixierten Zellen des Protein A-produzierenden Bakterienstamms *Staphylococcus aureus* Cowan I oder kommerziell erhältliche Protein A-Sepharose verwenden. Beide Präparationen führen zu guten Ergebnissen wie Abbildung 7 und 8 zeigen.

Waschen der Präzipitate

Durch unspezifisch gebundene Proteine bei der Immunpräzipitation kann die Analyse der Bandenmuster des IEF-Gels erschwert werden. Daher wurde das Präzipitat insgesamt sechs Mal mit verschiedenen Puffern (A, B, C) mit absteigender Salzkonzentration gewaschen, was sich in einer Reduktion des Hintergrundes gegenüber viermaligen Waschens mit einem Puffer mit geringerem Salzgehalt (NET) bemerkbar machte.

Neuraminidasebehandlung



Abbildung 8: 1 D-IEF mit SCD B-LCL; Vergleich verschiedener Adsorbentien und Neuraminidasen

- I: Protein A-Sepharose; Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* der Fa. Behring;
- II: Protein A-Sepharose; Sigma Neuraminidase Typ VI aus *Clostridium perfringens*;
- III: Protein A-Sepharose; Sigma Neuraminidase Typ VIII aus *Clostridium perfringens*;
- IV: Staph. aureus Zellen; Sigma Neuraminidase Typ VIII;

Bei der Auftrennung der präzipitierten HLA-Antigene durch Isoelektrofokussierung muß beachtet werden, daß der Zuckeranteil, und hier vor allem die geladenen

Neuraminsäuregruppen den isoelektrischen Punkt (pI) des gesamten Glycoproteins mitbestimmen.

Bei der biosynthetischen Markierung der Zellen und der anschließenden Präzipitation können Glycoproteine verschiedener Reifungsstufen erfaßt werden, die sich bei gleicher Aminosäurezusammensetzung in ihrem Glycosylierungsgrad unterscheiden und damit unterschiedliche isoelektrische Punkte aufweisen. Um bei den HLA-Antigenen ein vom Zuckergehalt unabhängiges Bandenmuster zu erhalten, wurden die Neuraminsäurereste des Glycoproteins durch eine Behandlung mit Neuraminidase abgespalten. Bei drei parallelen Immunpräzipitationen wurden unterschiedlich aufgereinigte Präparationen dieses Enzyms aus *Clostridium perfringens* sowie ein Reagens aus *Vibrio cholerae* getestet. Wie bei Abbildung 8 dargestellt, konnte kein Unterschied im Bandenmuster bei den verschiedenen Enzympräparationen festgestellt werden. Im folgenden wurde deshalb das preisgünstige Präparat aus *Vibrio cholerae* weiterverwendet.

Isoelektrofokussierung

Gegenüber früher angewendeten Methoden (Hahn et al., 1984) wurde die 1 D-IEF mit einer erhöhten Spannung von maximal 1000 V durchgeführt; außerdem wurde das Fokussierungsgel auf eine Dicke von 0,75mm reduziert, die eine Handhabung des Gels nach dem Lauf gerade noch zuläßt. Neben der größeren Bandenschärfe und dem höheren Auflösungsvermögen durch die höhere Feldstärke ergibt sich eine Kosteneinsparung durch den geringeren Chemikalienverbrauch.

2. Biochemische Analyse von Varianten des HLA-B35 Antigens

Analyse von verschiedenen CTL-definierten B35-Subtypen

Die in 1. beschriebenen Vorversuche erlaubten nun eine weitaus exaktere Analyse einzelner HLA-Antigene als dies bei früheren Arbeiten möglich war. Abbildung 9 zeigt zwei Fokussierungsgele, bei denen jeweils B-LCL von verschiedenen, serologisch B35 positiv typisierten Blutspendern untersucht wurden.

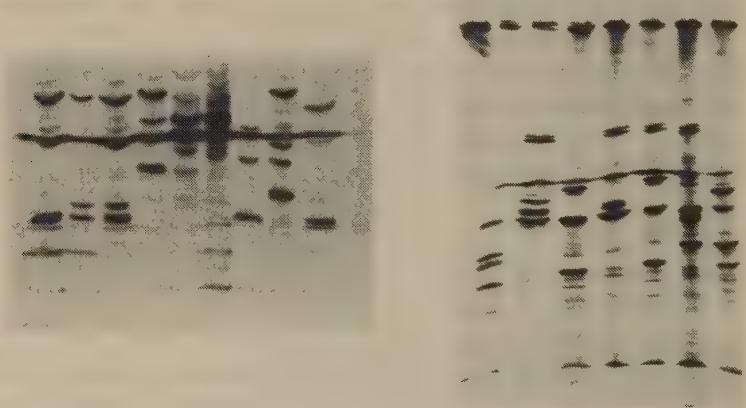


Abbildung 9: Vergleich zweier Isoelektrofokussierungen mit unterschiedlichen Präparationsmethoden

Weitere Erklärung im Text.

In der linken Abbildung ist eine Auftrennung zu sehen, die mit den Methoden aus früher publizierten Arbeiten durchgeführt wurde. Die typische Doppelbande des A2-Antigens im oberen Teil des Gels konnte bei diesem Experiment nicht aufgetrennt werden. Obwohl beide Male mit dem gleichen monoklonalen Antikörper W6/32 präzipitiert wurde, lassen sich kaum die fünf Banden unterscheiden, die für die HLA-A- und -B-Antigene einer auf

beiden Loci heterozygoten Zelle typisch sind. Dazu gehören die schweren Ketten des jeweiligen Antigens und das daran nonkovalent gebundene β_2 -Mikroglobulin, das als gemeinsame Bande aller Präzipitate in der Mitte des Gels zu sehen ist.

Das Fehlen einzelner Banden ist daher einerseits durch die unvollkommene Auftrennung zu erklären, bei der Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten zu einer einzigen Bande verschwimmen, andererseits durch Bedingungen, die eine gleichmäßige Markierung aller HLA-Antigene nicht zulassen. Ein weiteres Hindernis bei der Analyse früherer Fokussierungsgele stellen verschiedene Hintergrundbanden dar, die möglicherweise auf eine unvollständige Abtrennung der Neuraminsäurereste bei der Behandlung mit Neuraminidase zurückzuführen sind. Die rechte Abbildung zeigt dagegen die Auftrennung von W6/32-Präzipitaten aus B35-typisierten Lymphocyten, bei der eine genaue Analyse der Subtypen gut durchzuführen ist. Mit Ausnahme der im A-Lokus homozygoten Zelle in Spur 3 sind in jeder Spur die vier polymorphen Banden der A- und B-Antigene sowie das allen Zellen gemeinsame β_2 -Mikroglobulin im oberen Teil des Gels gut erkennbar. Die Bande etwas anodal (unterhalb) davon liegt bei allen Zellen auf gleicher Höhe. Da die analysierten Zellen als einziges gemeinsames Merkmal ihre serologische Typisierung als B35-positiv haben, muß es sich bei der Bande um dieses Antigen handeln. Als weiteres Merkmal besitzen vier der sieben Zellen die A2-Doppelbande im kathodalen (oberen) Bereich des Fokussierungsgels.

Durch den Vergleich von gemeinsamen Typisierungsmerkmalen mit gemeinsamen Banden bei der Isoelektrofokussierung lassen sich serologisch definierte HLA-Proteine den biochemisch charakterisierten zuordnen.

Die Verbesserung der Analysemethoden der 1 D-IEF erlaubte nun eine zuverlässige Untersuchung von HLA-Antigenen und deren Subtypen, sofern sie sich im isoelektrischen Punkt unterscheiden. Um verschiedene, durch zytotoxische T-Lymphocyten definierte Subtypen auf ihre Variabilität bezüglich der Ladungsdifferenzen ihrer

Polypeptidkette zu untersuchen, wurde ein Panel von Lymphocyten analysiert, das freundlicherweise von B. Breur-Vriesendorp (Amsterdam) zu Verfügung gestellt wurde und vier durch CTL unterscheidbare Subtypen repräsentiert. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der serologischen, zellulären und biochemischen Untersuchung dieser Zellen.

Zelllinie	Serologische Typisierung						B35-Subtyp	
							(CTL)	(IEF)
								(A'dam) (München)
1022 (B-LCL)	A2	A3	B35	B27	Cw1	Cw4	A	B35.4 B35.4
1581 (B-LCL)	A2	A11	B35	B27	Cw2	Cw4	B	B35.1 B35.1
2181 (PHA-B1.)	A24	A32	B35	B60	Cw3	Cw4	C	- B35.4
0133 (B-LCL)	A2	A3	B35	B27	Cw2	Cw4	D	- B35.1
1171 (B-LCL)	A11	A24	B35	B27	Cw4	-	-	B35.2 B35.2

Tabelle 1: Charakterisierung von HLA-Antigenen aus Lymphocyten eines niederländischen Blutspenderpanels

Abbildungen 10A und B zeigen Fokussierungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Eine schematische Darstellung der aufgetrennten HLA-Antigene ist in Abbildung 11 zu sehen. Durch die Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß Subtypen, die in ihrem isoelektrischen Punkt differieren, auch im CML-Test eine unterschiedliche Reaktion zeigen.

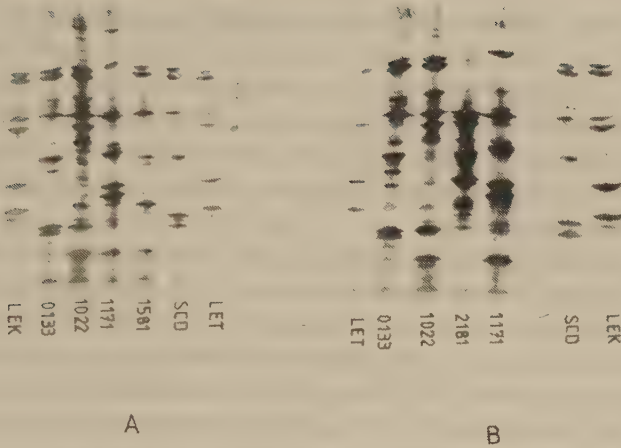


Abbildung 10: Analyse von Zellen holländischer Blut-spender zur Charakterisierung von Subtypen von HLA B35

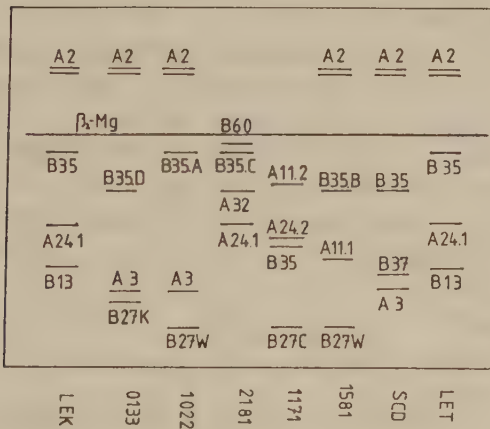


Abbildung 11: Schematische Darstellung der den HLA-A und -B-Antigenen entsprechenden Banden des IEF-Gels

Die durch CTL unterscheidbaren Untergruppen B35.A und B35.C der Zelllinien 1022 und 2181 ließen sich nicht durch Differenzen im isoelektrischen Punkt ihres Proteinteils bestätigen. Auch bei den Antigenen B35.B und D der Zelllinien 1581 und O133 wurden keine biochemischen Unterschiede bezüglich ihres isoelektrischen Punktes festgestellt .

Eine erste biochemische Charakterisierung von drei der fünf Zellen wurde bereits im Labor von P.Ivanyi durchgeführt. Durch die hier durchgeführte IEF-Analyse wurden die in der Amsterdamer Arbeitsgruppe gefundenen Splits von B35.1, B35.2 und B35.4 der Zellen 1581, 1171 und 1022 bestätigt. Der isoelektrische Punkt von B35.4 ist nur wenig saurer als der von β_2 -Mikroglobulin, was sich in einer Bande knapp unterhalb der bei allen Zellen konstanten Mittelbande ausdrückt. Die B35.1 zuzuordnende Bande liegt weiter im saureren Bereich auf der Höhe der A32-Bande der Zelle 2181. Das B35.2-Antigen der Zelle 1171 ist noch weiter anodal im unteren Drittel des Gels zu finden.

Die bisher nicht biochemisch charakterisierten HLA-Antigene der Zelllinien O133 und 2181 konnten den Subtypen B35.1 und B35.4 zugeordnet werden.

Neben B35 konnte unter anderem auch B27 durch CTL-Analyse in Subgruppen unterteilt werden (Breur-Vriesendorp et al., 1986). Die untersuchten Zellen wurden folgendermaßen typisiert:

- O133: B27K
- 1022: B27W
- 1171: B27C
- 1581: B27W

Bei der biochemischen Analyse konnten Differenzen im isoelektrischen Punkt von B27K (basischer) im Vergleich zu B27W und C (saurer) festgestellt werden. Auch zwei weitere serologisch nicht unterscheidbare Antigene, A11 und A24, lassen sich durch IEF in jeweils zwei Subtypen aufspalten (vergleiche auch Neefjes et al., 1986).

B35-Subtypen eines Münchner Blutspenderpanels

Sechszwanzig Blutspender aus dem Münchner Raum (mit Ausnahme der Zellen LEK und LET), die alle kaukasischer Herkunft sind, wurden serologisch typisiert und zeigen als gemeinsames Merkmal das HLA B35-Antigen. Der serologische Phänotyp der Lymphocyten findet sich in Tabelle 2. Zwei dieser Zellen (SCD und LEK) wurden mit dem vorher untersuchten Panel verglichen und konnten auf diese Weise als B35.1 (SCD) und B35.4 (LEK) typisiert werden. Die Präzipitate der übrigen Zellen wurden mit diesen zweien verglichen und so bezüglich ihres Subtyps klassifiziert.

Abbildungen 12A bis F zeigen die Auftrennung der HLA A- und B-Produkte dieser Zellen durch 1 D-IEF.

Fünf der untersuchten 26 Blutspender besitzen das B35-Antigen des Subtyps B35.4 (LEK, LET, NEM, SCH und STV), während die restlichen 21 den Subtyp B35.1 exprimieren. Auch das B27-Antigen der Zelle WAM wurde auf diese Weise typisiert und konnte dem saureren B27 Subtyp (B27W bzw. C) zugeordnet werden.

Nr.	Zelle	Zelltyp	HLA-Antigene					
(1)	DOM	PHA-B1.	A28		B35		Cw4	
(2)	DUA	PHA-B1.	A2	A32	B35	B7	Cw4	
(3)	ETU	PHA-B1.	A3	A25	B35	B38	Cw4	
(4)	FEH	PHA-B1.	A1	A3	B35	B38	Cw4	Cw6
(5)	GUA	PHA-B1.	A2	A24	B35	B7	Cw4	Cw6
(6)	HAC	PHA-B1.	A3	A32	B35	B7	Cw4	Cw8
(7)	KOM	PHA-B1.	A2	A30	B35	B13	Cw4	Cw6
(8)	LAC	PHA-B1.	A2	A33	B35	B65	Cw4	Cw8
(9)	LEK	B-LCL	A2	A24	B35	B13	Cw4	
(10)	LET	B-LCL	A2	A24	B35	B13	Cw4	
(11)	MEM	PHA-B1.	A2	A24	B35	B8	Cw4	Cw2
(12)	NEM	PHA-B1.	A3	A31	B35	B62	Cw4	Cw3
(13)	NIF	PHA-B1.	A3	A29	B35	B65	Cw4	Cw8
(14)	PEM	PHA-B1.	A2		B35	B44	Cw4	Cw2
(15)	PRG	PHA-B1.	A25	A28	B35	B18	-	-
(16)	RAG	PHA-B1.	A3	A29	B35	B45	Cw4	Cw6
(17)	RIP	PHA-B1.	A1	A3	B35		Cw4	
(18)	RIM	PHA-B1.	A2	A23	B35	B62	Cw3	
(19)	SCH	PHA-B1.	A1	A3	B35	B62	Cw4	Cw3
(20)	SCD	B-LCL	A2	A3	B35	B37	Cw4	
(21)	STA	PHA-B1.	A2	A34	B35	B62	Cw4	Cw3
(22)	STV	PHA-B1.	A2	A28	B35	B52	Cw4	Cw2
(23)	WAM	PHA-B1.	A2	A3	B35	B27	Cw4	Cw2
(24)	WIM	PHA-B1.	A2	A11	B35	B18	Cw4	Cw7
(25)	WIV	PHA-B1.	A2	A24	B35	B62	Cw4	Cw3
(26)	ZIL	PHA-B1.	A1	A68	B35	B65	Cw4	Cw8

Tabelle 2: HLA-Phänotypen des Münchener Blutspenderpanels

Anmerkung: LEK und LET sind HLA-identische Geschwister

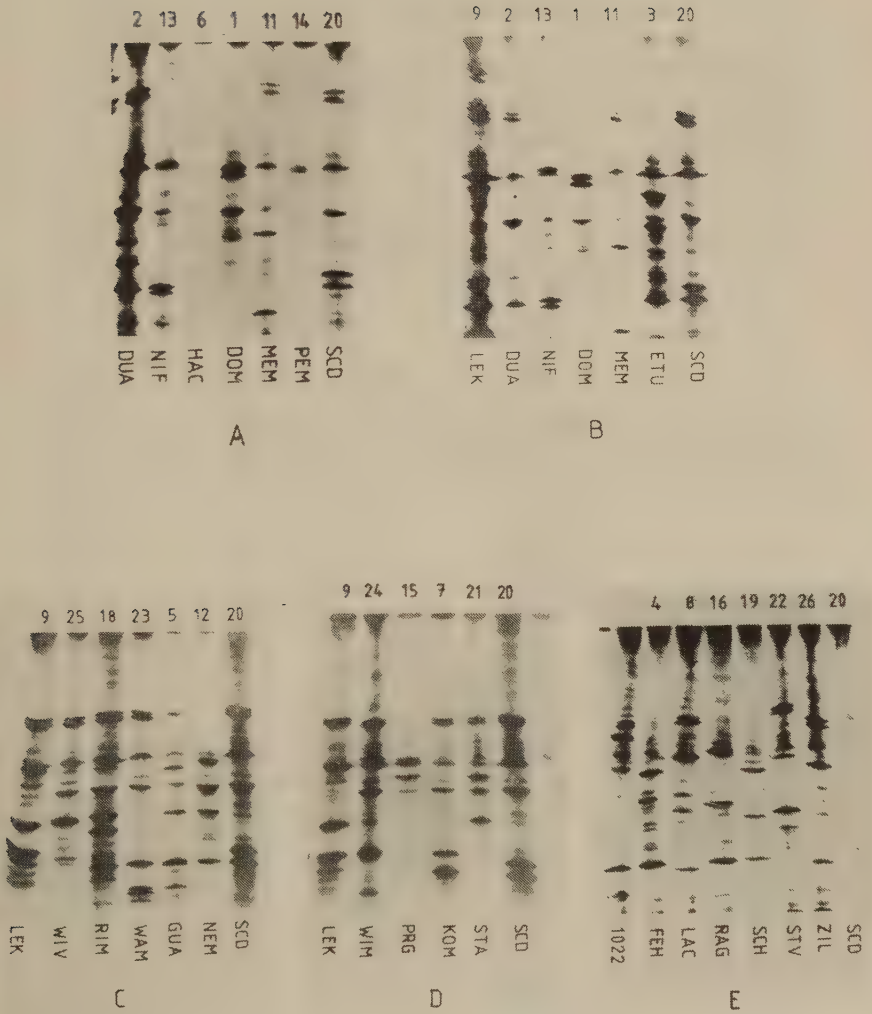


Abbildung 12: Analyse von HLA-Antigenen aus den Zellen eines Münchner Blutspenderpanels durch 1-D Isoelektrofokussierung

Assoziation mit zellulär definierten Subgruppen

Bei früheren Untersuchungen (Schiel, 1985) konnten bereits Subtypen von B35 gefunden werden, die sich durch ihre Reaktion mit B35-spezifischen zytotoxischen T-Lymphocyten unterscheiden lassen. Durch das Lyse-muster bei der zellvermittelten Lympholyse mit geeigneten Effektor-Zielzellkombinationen wurden drei Subgruppen charakterisiert (siehe Tabelle 3).

	CTL 1 SCDxRIP B35.B	CTL 31 WAMxRIP B35.B	CTL 27 PEMxSCD B35.A	CTL 32 SCHxNIF B35.A	CTL 11 HACxSCD B35.C	CTL 29 HACxWAM B35.C	CTL 30 HACxMEM B35.C
RAG	20	nt	nt	nt	95	nt	nt
PEM	54	60	14	59	50	81	41
MEM	21	18	45	69	43	51	100
SCD	9	26	100	131	100	44	48
WAM	23	12	68	97	94	100	104
PRG	42	40	88	88	30	14	7
ETU	51	28	84	50	16	7	13
NIF	12	21	90	100	18	16	11
HAC	11	0	78	72	22	1	9
ZIL	74	62	75	134	22	nt	13
DOM	76	76	74	106	25	nt	15
RIP	100	100	12	116	29	1	20
SCH	63	79	22	31	26	35	12
FEH	50	54	14	nt	49	nt	7

Tabelle 3: Erkennung von B35-Subtypen durch spezifische zytotoxische T-Lymphocyten (nach Schiel, 1985)

oben: ResponderxStimulator-Paare

seitlich: Zielzellen

Werte angegeben in (%) relative cytotoxic response

Ein Vergleich dieser zellulär definierten B35-Subtypen mit denen durch biochemische Analyse ermittelten zeigt Tabelle 4.

<i>Zelle</i>	<i>CML-Subtyp</i>	<i>IEF-Subtyp</i>
<i>DOM</i>	<i>35A/35B</i>	<i>35.1</i>
<i>ETU</i>	<i>35A</i>	<i>35.1</i>
<i>FEH</i>	<i>?</i>	<i>35.1</i>
<i>HAC</i>	<i>35A</i>	<i>35.1</i>
<i>MEM</i>	<i>35C</i>	<i>35.1</i>
<i>NIF</i>	<i>35A</i>	<i>35.1</i>
<i>PEM</i>	<i>35C</i>	<i>35.1</i>
<i>PRG</i>	<i>35A</i>	<i>35.1</i>
<i>RAG</i>	<i>35C</i>	<i>35.1</i>
<i>RIP</i>	<i>35B</i>	<i>35.1</i>
<i>SCD</i>	<i>35A/35C</i>	<i>35.1</i>
<i>SCH</i>	<i>35B</i>	<i>35.4</i>
<i>WAM</i>	<i>35A/35C</i>	<i>35.1</i>
<i>ZIL</i>	<i>35A/35B</i>	<i>35.1</i>

Tabelle 4: Vergleich zellulär und biochemisch ermittelter B35-Subtypen

Bei einem Vergleich der Klassifikation der Antigene entsprechend den CML-Ergebnissen zu der der IEF-Analyse konnte keine Korrelation festgestellt werden. Zellen aus allen drei zellulär definierten Subgruppen wurden in der biochemischen Analyse bezüglich ihres B35-Antigens als B35.1 klassifiziert. Die einzige in der IEF abweichende Zelle SCH zeigte in der CML keine auffällige, von den übrigen Zellen abweichende Reaktion.

Assoziation mit B35/B44-kreuzreagierenden zytotoxischen T-Lymphocyten

Im Rahmen früherer Arbeiten (Schendel et al., 1977) wurden zwei zytotoxische T-Zelllinien A.1 und A.2 generiert, die beide spezifisch Zellen erkennen, die das B35- oder B44-Antigen besitzen. Bei einem Test mit 127 Zielzellen trugen 40 von 47 (= 85%) positiv reagierenden Zellen das Antigen B35 oder B44. Umgekehrt wurden jedoch nur 40 von 68 (= 59%) Zellen mit einem der beiden Antigene lysiert. Um festzustellen, ob dieses Verhalten auf die Existenz biochemisch definierbarer Subgruppen zurückzuführen ist, wurde die lytische Aktivität von A.1/A.2 auf verschiedenen Zielzellen mit deren Klassifikation in der IEF verglichen:

Zelle	Lyse durch CTL		B35-Subtyp, definiert durch IEF
	A.1	A.2	
DOM	94	112	35.1
LEK	65	96	35.4
MEM	38	63	35.1
PEM	47	73	35.1
SCD	100	98	35.1
SCH	30	27	35.4
WAM	93	105	35.1
ETU	45	20	35.1
FEH	23	24	35.1
HAC	23	8	35.1
NIF	45	24	35.1
PRG	29	18	35.1
RIP	12	20	35.1
ZIL	39	15	35.1

Tabelle 5: Vergleich der lytischen Aktivität von CTL A.1/A.2 mit den IEF-definierten B35-Subtypen der Targetzellen

Werte angegeben in (%) relative cytotoxic response

Zwar finden sich beide der mit B35.4 klassifizierten Zellen LEK und SCH bei den durch A.1/A.2 lysierten Zellen, jedoch läßt sich aufgrund der anderen B35.1 zugeordneten und von CTL A.1 und A.2 lysierten Zellen keine Korrelation zu dem biochemisch definierten Subtyp herstellen.

Assoziation mit anderen Antigenen des HLA-Komplexes

Viele HLA-Antigene stehen häufig in einem Kopplungsungleichgewicht mit anderen Produkten des HLA-Komplexes und bilden dadurch einen sogenannten "Extended Haplotype". Schon bei früheren Arbeiten (Schendel et al., 1984a) zeigte sich, daß Träger von HLA B35 bezüglich ihrer übrigen Antigene im MHC-Komplex einen sehr heterogenen Charakter besitzen.

Zelle	Glo	DQ	DR	C4		Bf	C2	HLA		
				B	A			B	C	A
DUA	-	-	-	0	3	-	-	35.1	4	32
	-	-	-	1	3	-	-	7	-	2
LAC	1	8	8	2	3	-	C	35.1	4	2
	1	1	1	1	2	-	C	65	8	33
NEM	2	1	-	2	0	S	-	35.4	4	31
	1	3	4	2	4	S	-	62	3	3
PEM	1	-	2	1	3	S	-	35.1	4	2
	2	-	2	1	3	F	-	44	2	2
PRG	2-1	-	-	0,2	2	S-S ₁	-	35.1	-	28
	-	-	-	2	4	-	-	18	-	25
RIP	2	3	-	1	3	S	C	35.1	4	3
	2	1	-	1	0	S	C	35.1	-	3
RIM	1	-	-	2,9	4	F	C	35.1	3	23
	1	-	-	1	3	S	C	62	3	2
SCD	1	-	-	0	3/2	F	-	35.1	4	3
	1	-	-	1	0	F	-	37	-	7
STA	2	1	13	1	3	S	C	35.4	4	24
	2	1	2	1	2	S	C	52	2	2
WAM	1	-	-	0	3/2	F	C	35.1	-	3
	2	-	-	0	3	S	C	27	-	2
WIM	2	1	1	0	3	F	C	35.1	4	11
	1	-	8	2	4	S	C	18	7	2
WIV	1	1	1	0	3	S	C	35.1	4	24
	2	3	12	1	3	S	C	62	3	2

Tabelle 6: Haplotypen bei Trägern des B35-Antigens, die durch 1 D-IEF charakterisiert wurden

Bei 18 untersuchten Haplotypen konnten 9 verschiedene Komplotypen identifiziert werden. Bei den Haplotypen 1 3 S C (C4B: 1; C4A: 3; Bf: S; C2: C;), O 3 F C und O 3/2 F C konnte eine erhöhte Häufigkeit festgestellt werden. Bei der IEF-Analyse konnte bezüglich der Subtypen von B35 keine Assoziation mit einem bestimmten Haplotyp erkannt werden (vergleiche Tabelle 6).

*Assoziation von B35-Subtypen zu Krankheiten -
Subakute Thyreoiditis (De Quervain)*

In verschiedenen Studien (Bech et al., 1977; Nyulassy et al., 1975, 1977) konnte eine klare Assoziation der Schilddrüsenkrankheit zu HLA B35 nachgewiesen werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Sasazuki (Japan) sollte nun untersucht werden, ob eine Verbindung der Krankheit zu einer der Untergruppen dieses Antigens herzustellen ist.

Zelle	Serologisch ermittelter HLA-Phänotyp								Kontrolle/ Patient
	A		B		C		DR		
SO (C10)	9		35	39	3		7	2	K
YH (C13)	2	31	35	51	-		5	w8	K
SI (C14)	2	26	35	40	3	-	w8	-	K
KK (51)	24	26	35	5	3	7	2	w9	P
NY (61)	33		35	12	3	-	4	w13	P
IH (64)	2	31	35	40	4	7	w8	w9	P
KS (86)	2	33	35	44	3	-	3	-	P

Tabelle 7: HLA-Phänotyp von Patienten mit subakuter Thyreoiditis sowie gesunden Kontrollprobanden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben EBV-transformierte B-LCL von japanischen Blutspendern untersucht. Vier davon stammten aus Patienten, während die drei übrigen aus einer gesunden Kontrollgruppe kamen (vergleiche Tabelle 7).

Das Ergebnis dieser IEF zeigen die Abbildungen 14 und 15.

Bei allen sieben untersuchten Zellen zeigte sich der gleiche Subtyp B35.1, sodaß hiermit gezeigt wurde, daß die Krankheit nicht in Assoziation mit einer der Untergruppen von B35 zu bringen ist.

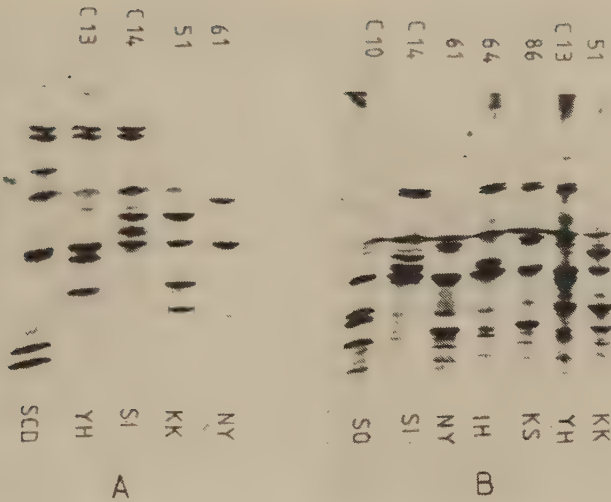


Abbildung 14: Untersuchung von B-LCL aus japanischen Blutspendern mit subakuter Thyreoiditis sowie gesunden Kontrollprobanden

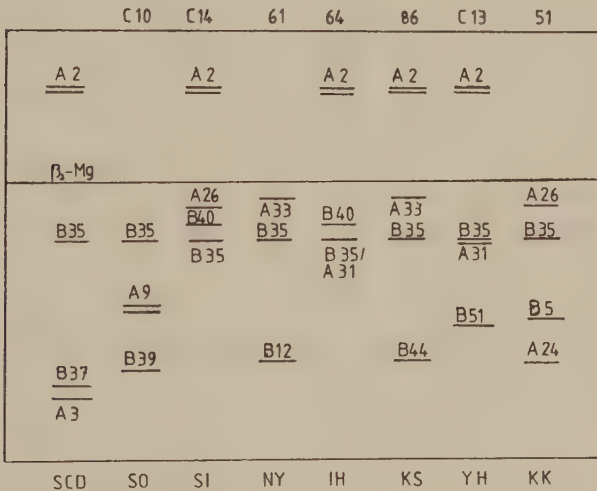


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Banden der HLA-Antigene aus der IEF in Abbildung 14

3. Biochemische Analyse von Varianten des HLA-B44 Antigens

Untersuchung durch 1 D-IEF

Bereits in früheren Arbeiten (Hahn et al., 1984; Neefjes et al., 1986; Kuskall et al., 1987) konnte gezeigt werden, daß das HLA-Antigen B44 in mehrere biochemisch unterscheidbare Subtypen aufgesplittet werden kann. Dabei konnten zwei Typen B44 I und B44 II identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere serologisch als B44 typisierte und biochemisch bisher noch nicht charakterisierte Zellen untersucht.

Der durch Antiseren bestimmte HLA-Phänotyp dieser Zellen findet sich in Tabelle 8.

Nr.	Zelle	HLA-Phänotyp				Subtyp, bestimmt durch	
		(serolog. Typisierung)				CTL	IEF
(1)	ABM	A32		B44	Cw5	I	I
(2)	BAL	A24	A29	B44	B40	Cw2	II
(3)	HEJ	A2	A11	B44	B7	Cw7	I
(4)	KOS	A24	A26	B44	B7	Cw3	I
(5)	OLN	A1	A25	B44	B37	Cw4	II
(6)	PEM	A2		B44	B35	Cw2 Cw4	II
(7)	POG	A2	A25	B44	B8	Cw5 Cw7	II
(8)	POM	A2	A32	B44	B51	Cw1	I
(9)	WAR	A2		B44		Cw5	I
(10)	ZIS	A2	A29	B44		Cw5	I+II

Tabelle 8: HLA-Phänotyp der durch IEF untersuchten B44-tragenden Zellen

Die durch Isoelektrofokussierung erhaltenen Bandenmuster dieser Zellen zeigen die Abbildungen 16 und 17.

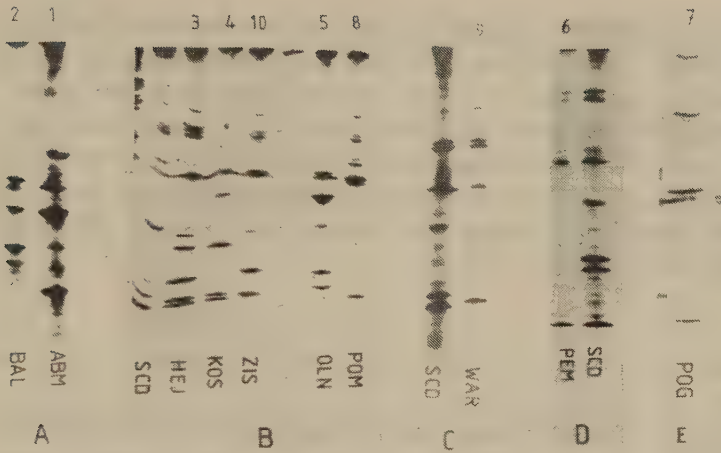


Abbildung 16: 1 D-IEF von HLA B44 tragenden Zellen

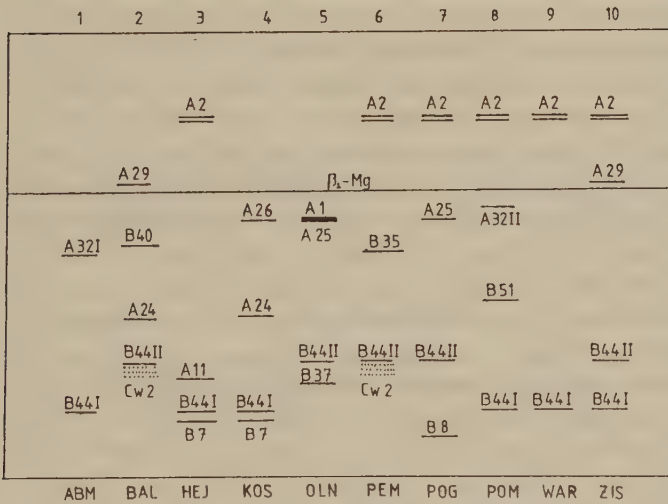


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Banden der IEF-Analyse von Abbildung 16

Vier der untersuchten Zellen tragen den B44 I-Subtyp während fünf Zellen den B44 II-Subtyp besitzen. Die drei Zellen ABM, WAR und ZIS scheinen nach der serologischen Typisierung jeweils auf dem B-Locus homozygot zu sein (ABM und WAR auch auf dem A-Locus). Nach der Untersuchung durch IEF konnte dieser Befund für ABM und WAR bestätigt werden, ZIS jedoch weist beide Antigene B44 I und B44 II auf.

Assoziation mit zellulär definierten Subtypen

Bereits früher konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß sich durch CTL, die spezifisch gegen dieses Antigen reagieren, zwei Subtypen definieren lassen, die mit den biochemisch charakterisierten zusammenfallen (Hahn et al., 1984).

Die Zellen ABM, KOS, POM, WAR UND ZIS wurden sowohl durch diese CTL als auch durch IEF charakterisiert und bestätigten die früheren Beobachtungen (Tabelle 8).

Wie schon im Kapitel über HLA B35 beschrieben, so sollte auch bei einigen dieser Zellen untersucht werden, ob sich eine Korrelation zu Subtypen finden läßt, die durch die zytotoxischen T-Lymphocyten A.1 und A.2 definiert werden. Wie erwähnt, reagieren diese CTL mit einem Teil der Zielzellen, die das B35- oder B44-Antigen tragen. Die durch Lyse mit diesen Effektorzellen charakterisierten zwei Gruppen zeigt Tabelle 9.

In diesem Falle konnte keine Korrelation zu Untergruppen gefunden werden, die solchermaßen definiert wurden. In beiden Gruppen A und B finden sich sowohl Zellen, die dem Subtyp B44 I angehören als auch solche mit B44 II. Die Erkennungsstruktur dieser CTL kann also nicht mit Unterschieden im isoelektrischen Punkt zwischen B44 I und B44 II zusammenhängen.

Gruppe	Zelle	Reaktion mit CTL (in % rel. response)		Subtyp (IEF)
		A.1	A.2	
A	ABM	125	100	I
	WAR	77	100	II
	PET	56	71	II
B	KOS	10	14	I
	POG	7	5	II
	POM	6	41	I

Tabelle 9: Lyse von B44 typisierten Zielzellen mit zytotoxischen T-Lymphocyten A.1 und A.2

4. Antigen-Mimikry - Charakterisierung von HLA B8

Wie beschrieben, wurden die CTL A.1 und A.2 bei Versuchen, zytotoxische T-Lymphocyten gegen B35 und B44 zu generieren, erhalten und zeigen eine Kreuzreaktivität gegen Zellen, die das andere der beiden Antigene auf ihrer Oberfläche tragen. Beide CTL stammen aus dem gleichen Spender MUG und unterscheiden sich nur durch ihre Stimulatorzellen (für A.1: SCD; für A.2: WAR). Dieses Reaktionsmuster zeigte sich auch bei CTL, bei deren Generierung EBV-transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien des gleichen Spenders als Stimulatorzellen verwendet wurden. Auch diese gegen Epstein-Barr-Virus-Determinanten gerichteten CTL zeigen Kreuzreaktivität mit B35- oder B44-tragenden Zellen, wie Tabelle 10 zeigt.

Effektor-/ Stimulatorzellen		HLA-Typisierung	Lyse von Zielzellen				
			Selbst- LCL	PHA	SCD	Allo- WAR	ABM
MUG	MUG _{LCL}	A2 B8 B40 DR2 DR3 DQw1	+	-	+	+	+
MUG	SCD _{PBL}		+	-	+	+	+
MUG	WAR _{PBL}		+	-	+	+	+
GAH	GAH _{LCL}	A1 B8 B57 Cw7 DR3 DR13 DQw1 DQw2	+	-	+	+	+
GAH	ABM _{PBL}		+	-	+	+	+
SCA	SCD _{PBL}	A1 B8 Cw7 DR3 DQw2	nt	nt	+	-	-
	WAR _{PBL}		nt	nt	-	+	+
THS	SCD _{PBL}	A1 A26 B8 B64 Cw7 Cw8 DR3 DR7 DQw2	nt	nt	+	-	-
	WAR _{PBL}		nt	nt	-	+	+

Tabelle 10: Kreuzreaktivität von CTL zwischen EBV transformierten Zielzellen und verschiedenen allogeneischen Zielzellen (nach Schendel et al., Manuskript eingereicht)

Anmerkung : Effektor-/Stimulatorzellkombinationen:
MUG/SCD = A.1
MUG/WAR = A.2

Die HLA-Typisierung bezieht sich auf die Effektorzellen Zielzellen:

Selbst,LCL = EBV-transformierte B-LCL des gleichen Spenders

Selbst,PHA = PHA-aktivierte PBL des gleichen Spenders

Allo = Zielzellen (PHA-Blasten) mit allogenen HLA-Antigenen:

SCD: A2 A3 B35 B37 Cw4

WAR: A2 B44 Cw5

ABM: A32 B44 Cw2 Cw5

nt = nicht getestet

Neben MUG konnten aus einem zweiten Spender GAH CTL generiert werden, die bei Stimulation mit einer B44-tragenden Zelle ein ähnliches Reaktionsmuster zeigten. Auch mit dieser Zelle konnten eigene EBV-transformierte B-LCL als auch B35- und B44-tragende Zellen lysiert werden.

Bei einem Vergleich der durch serologischen Typisierung bestimmten HLA-Antigene der zwei reaktiven Effektorzellpopulationen fallen die drei gemeinsamen Antigene B8, DR3 und DQw1 auf.

Zielzellen, auf denen sich virale Antigene befinden, werden nur dann von zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert, wenn die MHC-Antigene auf Effektor- und Zielzelle übereinstimmen (MHC-Restriktion; Zinkernagel und Doherty, 1974). In neueren Arbeiten wurde diese Beobachtung bestätigt und gezeigt, daß das MHC-Antigen mit dem Fremd-Antigen einen Komplex bildet, der vom T-Zell-Rezeptor der CTL erkannt wird (Buus et al., 1987).

In anderen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde durch Blockierungsversuche mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA Klasse I- und Klasse II-Antigene gezeigt, daß das Restriktionselement für die Lyse von B-LCL des gleichen Spenders ein HLA-Klasse I-Antigen sein muß. Dieses Restriktionselement könnte somit das beiden Zellen MUG und GAH gemeinsame B8-Antigen sein.

Zwei weitere Zellen SCA und THS, die ebenfalls dieses Antigen enthalten, zeigten keinerlei Kreuzreaktivität zwischen B35 und B44 bei gleicher Stimulation.

Ob diese Tatsache auf biochemische Unterschiede im HLA B8-Antigen der Blutspender zurückzuführen ist, sollte durch IEF-Analyse geklärt werden.

Die serologisch bestimmten HLA-Typen der vier Zellen sowie fünf weiteren, die jedoch nicht in einem CML (cell mediated lympholysis) -Test auf deren zytotoxische Eigenschaften untersucht wurden, zeigt Tabelle 11.

Zelle	HLA-Antigene (serologische Typisierung)					
MUG	A2		B8	B40		(CTL A.1/A.2)
GAH	A1		B8	B57	Cw7	(A.1/A.2 ähnlich)
SCA	A1		B8		Cw7	(≠ A.1/A.2)
THS	A1	A26	B8	B64	Cw7	Cw8 (≠ A.1/A.2)
COX	A1		B8		Cw7	
DOP	A3		B8	B27	Cw2	Cw7
HOW	A1	A2	B8	B7	Cw7	
MEM	A2	A24	B8	B35	Cw2	Cw4
POG	A2	A25	B8	B44	Cw5	Cw7
STM	A1	A2	B8	B17		

Tabelle 11: Serologisch bestimmte HLA-Typen von Zellen,
die auf Subtypen von B8 untersucht wurden

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die IEF-Muster dieser Zellen.

Im Gegensatz zu B35 und B44 konnte in keinem Fall eine Variante des B8-Antigens entdeckt werden, so daß Unterschiede im pI dieses Moleküls als Ursache für die unterschiedliche Reaktion der CTL ausscheiden.

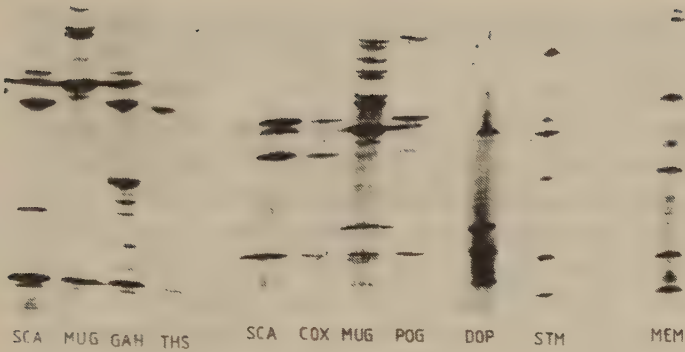


Abbildung 18: 1 D-IEF von HLA B8 tragenden Zellen

MUG	GAH	SCA	THS	COX	DOP	HOW	MEM	POG	STM
<u>A 2</u>						<u>A 2</u>	<u>A 2</u>	<u>A 2</u>	<u>A 2</u>
β_2 -Mg									
<u>B 40</u>	<u>A 1</u>	<u>A 1</u>	<u>A 1</u> A 26	<u>A 1</u>		<u>A 1</u>	<u>B 35</u>	<u>A 25</u>	<u>A 1</u>
	<u>B 57</u>						<u>A 24</u>	<u>B 44</u>	<u>B 17</u>
			<u>B 64</u>		<u>C w 2</u>		<u>C w 2</u>		
<u>B 8</u>	<u>B 8</u>	<u>B 8</u>	<u>B 8</u>	<u>B 8</u>	<u>A 3</u> <u>B 8</u> B 27	<u>B 7</u> <u>B 8</u>	<u>B 8</u>	<u>B 8</u>	<u>B 8</u>

Abbildung 19: Schematische Darstellung von Banden aus den Isoelektrofokussierungen von Abb. 18

5. Biochemische Charakterisierung von seltenen HLA-Antigenen

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, einige bisher noch nicht charakterisierte HLA A- und B-Antigene entsprechend ihres isoelektrischen Punktes einzuordnen. Die durch Antiseren definierten Antigene A34 (zugehörige Zelle: STA, Häufigkeit bei Kaukasiern: 1,0%), A68 (ZIL), B38 (ETU,FEH, 5,3%), B45 (RAG, 2,0%) sowie B64 (THS, 2,2%) konnten erstmals durch 1 D-IEF charakterisiert werden.

A68 zeichnet sich durch eine Doppelbande ähnlich der von A2 aus, die jedoch weiter im saureren Bereich liegt.

Bei den folgenden seltenen Antigenen wurden Abweichungen zu den bereits beschriebenen Fokussierungsmustern gefunden: B52 (STV, 2,9%), B57 (GAH, 6,5%), B65 (LAC,NIF,ZIL, 5,1%).

Bei der Zelle WIM, die serologisch als A2, A11, B18, B35 definiert wurde, konnte eine bisher noch nicht beschriebene Variante des A11-Antigens gefunden werden.

6. Darstellung von Produkten des HLA C-Lokus durch 1-D Isoelektrofokussierung

Nach den Ergebnissen der Arbeit von Güssow et al. (1987) zeigt der monoklonale Antikörper W6/32 keinerlei Reaktivität mit Produkten des HLA C-Lokus. Dagegen wurde das Cw1- und Cw2-Antigen mit einem anderen Antikörper HC-10 präzipitiert, der allein gegen die schwere Kette des Klasse I-Antigens gerichtet ist.

In anderen Berichten (Kahn-Perles et al., 1987, Ferrier et al., 1985) wird von einer Reaktivität von W6/32 auch gegen HLA C-Produkte berichtet.

Bei einem Vergleich von Zellen, die serologisch als Cw2-positiv typisiert wurden (Tabelle 12), ließen sich schwache Banden im anodalen Bereich des IEF-Gels erkennen, wie sie von Güssow et al. bei der Präzipitation mit HC-10 beschrieben wurden (in den schematischen Darstellungen gepunktet dargestellt).

<i>O133</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>B27</i>	<i>B35</i>	<i>Cw2</i>	<i>Cw4</i>
<i>MEM</i>	<i>A2</i>	<i>A24</i>	<i>B8</i>	<i>B35</i>	<i>Cw2</i>	<i>Cw4</i>
<i>PEM</i>	<i>A2</i>		<i>B35</i>	<i>B44</i>	<i>Cw2</i>	<i>Cw4</i>
<i>STV</i>	<i>A2</i>	<i>A28</i>	<i>B35</i>	<i>B52</i>	<i>Cw2</i>	<i>Cw4</i>
<i>WAM</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>B18</i>	<i>B35</i>	<i>Cw2</i>	<i>Cw4</i>
<i>BAL</i>	<i>A24</i>	<i>A29</i>	<i>B40</i>	<i>B44</i>	<i>Cw2</i>	
<i>DOP</i>	<i>A3</i>		<i>B8</i>	<i>B27</i>	<i>Cw2</i>	<i>Cw7</i>

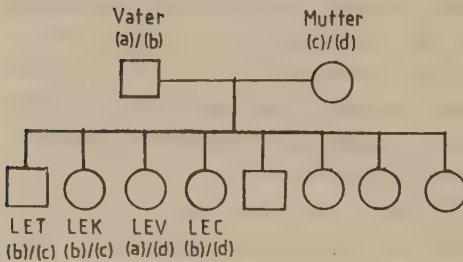
Tabelle 12: HLA-Typisierung von Zellen mit dem Cw2-Allel auf der Zelloberfläche

Auch bei den übrigen Zellen sind schwache Banden erkennbar, bei denen es sich um Produkte des HLA-C-Lokus handeln könnte. Die unterschiedlich starke Markierung verschiedener Zellen und weiterer nicht bestimmbarer Präzipitate lassen eine sichere Identifizierung dieser Antigene jedoch nicht zu.

7. Antigen-Mimikry - Charakterisierung von CTL-Determinanten durch monoklonale Antikörper

(A) Klasse II-Region

In den bereits beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß weder Subtypen von B35 oder B44 auf den Zielzellen noch Varianten des B8-Antigens auf den Effektorzellen A.1 bzw. A.2 für das uneinheitliche Lysemuster gegenüber B35- oder B44-tragenden Zellen im Cell-mediated-Lympholysis-Test verantwortlich zu machen sind. Neben der bereits erwähnten Kreuzreaktivität gegenüber B35/B44 und EBV- (+Selbst-HLA) Antigenen auf transformierten B-Zelllinien konnte ein erstaunliches Zytotoxizitätsmuster bei Familienuntersuchungen gefunden werden (Schendel und Wank, 1981).



Haplotypen:

(a): A2 B27 Cw1 DR2

(b): A2 B13 - -

(c): A24 B35 Cw4 DR3

(d): A3 B7 - DR2

Abbildung 20: Stammbaum der Familie LE

So wurden die Zellen der HLA-identischen Geschwister LEK und LET durch die CTL A.1 und A.2 lysiert, während weder Vater noch Mutter noch eines der Geschwister LEV oder LEC von den CTL erkannt wurden. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß es sich hier um ein Phänomen von Transkomplementation handeln könnte, wobei zusätzlich zu dem B35-Antigen (oder einem damit assoziiertem Protein) des (c)-Haplotyps ein weiterer Faktor treten muß, der von den Haplotypen (a) oder (b) kodiert wird und die Lyse mit CTL A.1 oder A.2 ermöglicht.

Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern sollte die Zielzelldeterminante dieser zytotoxischen T-Zellen genauer charakterisiert werden. Für die Immunisierung von Mäusen wurden hierfür in einem Fall B-LCL aus LEK verwendet, in einem anderen Fall B-LCL aus der ebenfalls B35-tragenden Zelle SCD. Durch Bindungsstudien mit geeigneten Zielzellen, die mit Hilfe des single-cell-ELISA in unserem Labor durchgeführt wurden, konnten zwei interessant scheinende Klone identifiziert werden:

In beiden Fällen wurde eine Bindung der resultierenden Antikörper gegenüber EBV-transformierten B-Zellen der immunisierenden Zelle beobachtet, nicht jedoch an PHA-Blasten, die keine Virusantigene auf ihrer Oberfläche tragen.

Aufgrund der bereits früher beobachteten Kreuzreaktion von CTL zwischen EBV- und dem HLA B35/B44-Antigen (möglicherweise zusammen mit dem transkomplementierenden Faktor) wurden diese beiden Antikörper ID8 und IG7 einer genaueren Untersuchung unterzogen.

Immunpräzipitation und PAGE

Um die Natur des Zielantigens näher zu definieren, wurde eine Immunpräzipitation aus einem ^{35}S -markierten Zellysats mit anschließender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Autoradiogramm dieses Gels zeigt Abbildung 21:

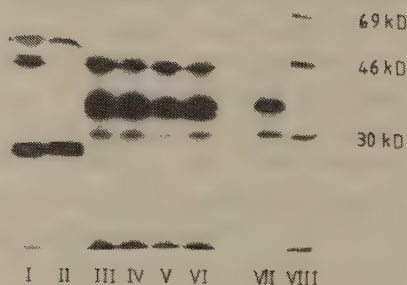


Abbildung 21: Immunpräzipitation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) von LEK B-LCL mit IG7, ID8 und L243 (anti DR)

I: Anti-Maus-Immunglobulin (Sigma Chemicals), gekoppelt an Protein-A-Sepharose
 II: Anti-Maus-Immunglobulin (Dako), gekoppelt an Protein-A-Sepharose
 III: ID8, gekoppelt über anti-Maus-Immunglobulin (Sigma Chemicals) an Protein-A-Sepharose
 IV: ID8, gekoppelt über anti-Maus-Immunglobulin (Dako) an Protein-A-Sepharose
 V: IG7, gekoppelt über anti-Maus-Immunglobulin (Sigma Chemicals) an Protein-A-Sepharose
 VI: IG7, gekoppelt über anti-Maus-Immunglobulin (Dako) an Protein-A-Sepharose
 VII: L243, gekoppelt an Protein A-Sepharose
 VIII: Molekulargewichtsmarker

Beide Antikörper scheinen ein Antigen zu präzipitieren, das dem von L243 erfaßten DR-Antigen ähnlich ist. Wie bei L243 sind auch hier zwei Banden erkennbar, deren Molekulargewicht bei etwa 30 bzw. 35 kD liegt. Es könnte sich also bei dem präzipitierten Protein um ein Klasse II-Molekül handeln, daß sich aus einer α -Kette von 33 kD und einer β -Kette von 28 kD zusammensetzt.

Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der weiteren Untersuchung wurde eine von Accolla (1983) beschriebene Mutante der Burkitt-Lymphomzelllinie Raji verwendet, deren Ia-Antigene nicht exprimiert werden. Dagegen können die Antigene des HLA-A-, -B- und -C-Lokus nachgewiesen werden.

Durch Immunfluoreszenzanalyse an einem FACScan[®]-Zyto-
meter wurde die Bindung der beiden Antikörper an die
Zelloberfläche dieser Zellen analysiert.

Die Ergebnisse dieser indirekten Immunfluoreszenz zei-
gen Tabelle 13 und Abbildung 22:

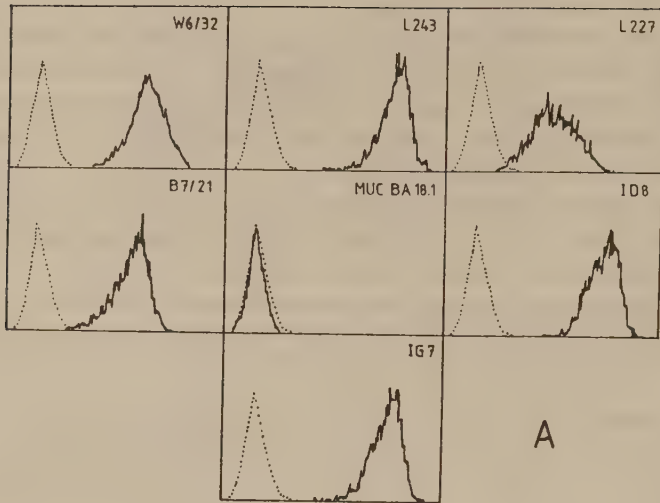
	W6/32 (Kl. I)	L243 (DR)	L227 (DR _{β111})	B7/21 (DP)	MUC BA 18.1 (Melanom)	ID8	IG7
Raji	99,6	99,5	93,1	99,3	0,9	99,8	99,8
RJ 2.2.5.	99,6	9,4	35,2	42,8	0,9	0,8	0,9

Tabelle 13: Indirekte Immunfluoreszenz der B-Zelllinie
Raji und deren Mutante RJ 2.2.5.

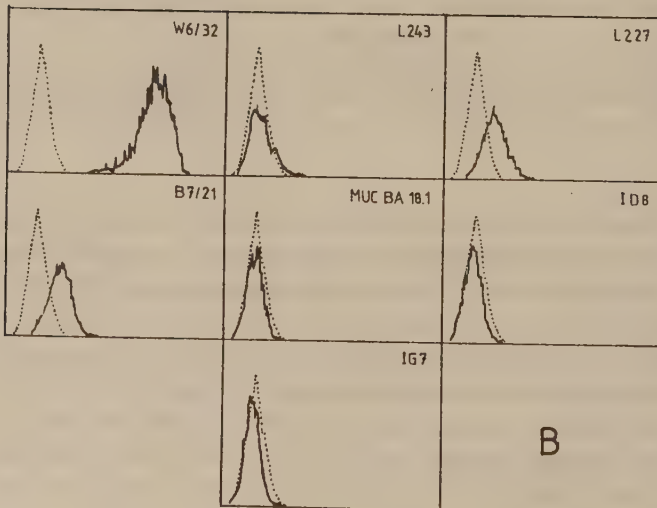
Angaben in (%) fluoreszierender Zellen gegenüber der
Negativkontrolle (durchgeführt mit dem monoklonalen
Antikörper MPC 11)

Als Kontrollen wurden die Antikörper W6/32 sowie der
DR-monomorphe mAb L243 verwendet. Ein weiterer mono-
klonaler Antikörper, L227, ist ebenfalls HLA-DR spezi-
fisch (Lampson und Levy, 1980), bindet im Gegensatz zu
L243 jedoch nur eine beiden funktionellen β -Ketten des
DR-Moleküls (J. Johnson, persönliche Mitteilung).

Wie zu sehen ist, reagieren beide Antikörper mit dem
Wildtyp, nicht jedoch mit der Mutante. Diese Beobach-
tung bestätigt somit das durch Immunpräzipitation er-
haltene Ergebnis.



A



B

Abbildung 22: Indirekte Immunfluoreszenz mit der Zelllinie Raji sowie deren Mutante RJ 2.2.5.

(A): Raji

(B): RJ 2.2.5.

Weitere Erklärung zu den Antikörpern im Text

Genau wie der DP-spezifische Antikörper B7/21 zeigt L227 eine schwache Bindung an die Mutante RJ 2.2.5.. Eine unspezifische Bindung des konstanten Antikörperteils durch den F_c -Rezeptor der Zelle konnte durch eine Isotypkontrolle mit dem Melanomantikörper MUC BA 18.1 (IgG₁) ausgeschlossen werden.

Die Bindung von B7/21 läßt darauf schließen, daß die gesamte Ia-Region nicht vollständig reprimiert ist, zumal es sich bei RJ 2.2.5. um keine Deletions- sondern um eine Regulationsmutante zu handeln scheint, deren Ia-Expression durch Fusion mit Ia⁺ Maus-Lymphomzellen wiederhergestellt werden kann.

Die Bindung von L227 läßt sich durch eine mögliche Kreuzreaktion mit anderen Oberflächenantigenen dieser Zelllinie erklären.

Durch die Bindung von Maus-Fibroblasten, die mit humanen DR-Genen transfiziert wurden (freundlicherweise von B. Mach, Genf zur Verfügung gestellt) sollte eine mögliche DR-Spezifität der beiden Antikörper nachgewiesen werden.

Die ursprüngliche Ltk⁻-Zelle wurde jeweils mit dem Gen für die α -Kette und einem der beiden funktionellen β -Kettengene des DR-Antigens transfiziert. Während L243 beide β -Ketten erkennt und somit auch an beide Transfektanten bindet, zeigt L227 nur Bindung an die mit DR_{B III} transfizierte Zelle (siehe Tabelle 14 und Abbildung 20). Sowohl IG7 als auch ID8 binden an beide Transfektanten und scheinen daher eine konstante Determinante des DR-Moleküls zu erkennen.

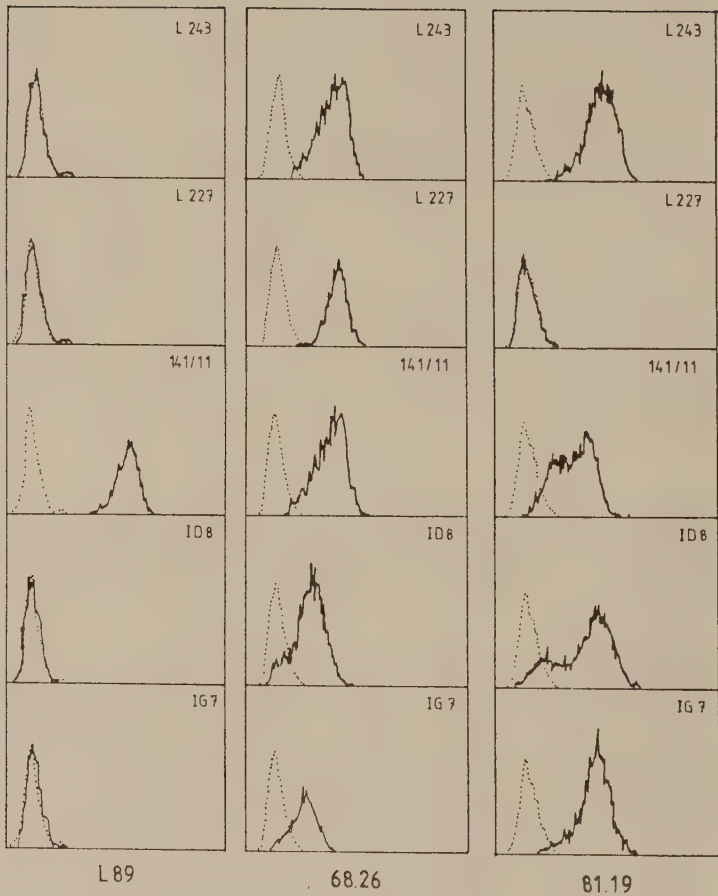


Abbildung 20: Indirekte Immunfluoreszenz mit den HLA-DR-transfizierten Maus-Fibroblastenzelllinien 68.26 und 81.19 sowie L89 (L-Zelle, transfiziert mit einem Melanom-assoziierten Gen) als Kontrolle

Monoklonale Antikörper für die Kontrollen:

L243 = anti DR($\beta_1 + \beta_2$)

L227 = anti DR(β_1)

141/11 = anti H-2

	L243 (DR β 1+111)	L227 (DR β 111)	141/11 (H-2)	ID8	IG7
L89	5,1	4,4	99,9	3,8	3,2
68.26	99,2	93,8	97,1	72,7	79,4
81.19	99,5	4,5	90,8	86,3	97,5

Tabelle 14: Indirekte Immunfluoreszenz mit
Transfektanten aus Maus-Fibroblasten

Angaben in (%) fluoreszierender Zellen gegenüber der
Negativkontrolle mit dem mAb MPC11

L89: Maus-Fibroblastenzelle, transfiziert
mit einem humanem Melanom-assoziierten Gen
68.26: Maus-Fibroblastenzelle, transfiziert
mit dem DR α - und dem DR β 111-Gen
81.19: Maus-Fibroblastenzelle, transfiziert
mit dem DR α - und dem DR β 1-Gen

Als Kontrollzelle wurde die Maus-L-Zelle L89 verwendet (freundlicherweise von J. Johnson, München zur Verfügung gestellt), die mit einem humanen Melanom-assoziierten Gen transfiziert wurde. Der monoklonale Antikörper 141/11, der ein Antigen des murinen H-2-Komplexes, nicht jedoch humane HLA-Antigene erkennt, diente als Positivkontrolle.

Inhibierung der Präzipitation durch Preclearing

Unter der oben getroffenen Annahme, daß es sich bei dem Zielzellantigen der beiden Antikörper um eine monomorphe DR-Determinante handelt, sollte es gelingen, eine Bindung von Antigen durch vorherige Immunpräzipitation mit einem anderen DR-spezifischen Antikörper zu verhindern.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigen die Abbildungen 24 und 25.

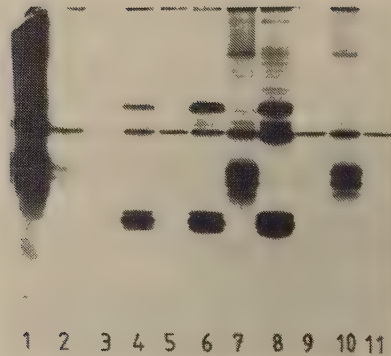


Abbildung 24: Immunpräzipitation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit ID8 nach vorherigem Preclearing mit L243 und einem anti-Klasse I Antikörper (HB 54)

- (1): Lysat 1: 1. Präzipitation mit L243
- (2): Lysat 1: 4. Präzipitation mit L243
- (3): Lysat 1: 6. Präzipitation mit L243
- (4): Lysat 1: Präzipitation mit anti-Immunglobulin-Protein A-Sepharose
- (5): Lysat 1: Präzipitation mit ID8
- (6): Lysat 2: Präzipitation mit anti-Immunglobulin-Protein A-Sepharose
- (7): Lysat 2: Präzipitation mit ID 8
- (8): Lysat 3: 1. Präzipitation mit HB54 (anti-HLA A2)
- (9): Lysat 3: 6. Präzipitation mit HB54
- (10): Lysat 3: Präzipitation mit ID8
- (11): Lysat 3: Präzipitation mit anti-Immunglobulin-Protein A-Sepharose

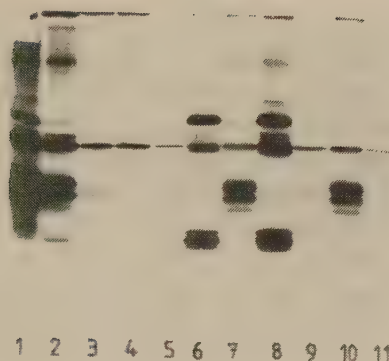


Abbildung 25: Immunpräzipitation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit ID8 nach vorherigem Preclearing mit L227 und einem anti-Klasse I Antikörper (HB 54)

- (1): Lysat 1: 1. Präzipitation mit L227
- (2): Lysat 1: 4. Präzipitation mit L227
- (3): Lysat 1: 6. Präzipitation mit L227
- (4): Lysat 1: Präzipitation mit ID8
- (5): Lysat 1: Präzipitation mit anti-Immunglobulin-Protein A-Sepharose
- (6): Lysat 2: Präzipitation mit anti-Immunglobulin-Protein A-Sepharose
- (7): Lysat 2: Präzipitation mit ID 8
- (8): Lysat 3: 1. Präzipitation mit HB54 (anti-HLA A2)
- (9): Lysat 3: 6. Präzipitation mit HB54
- (10): Lysat 3: Präzipitation mit ID8
- (11): Lysat 3: Präzipitation mit anti-Immunglobulin-Protein A-Sepharose

Durch vorherige Präzipitation mit L243 wird der größte Teil des von ID8 erkannten Antigens entfernt. Der noch verbleibende Rest an Antigen läßt möglicherweise auf eine höhere Affinität von ID8 gegenüber L243 schließen. Obwohl L227 nur eine der zwei funktionellen β -Ketten des DR-Antigens erkennt (β_{111}), wird das Lysat nahezu vollständig von ID8-bindendem Material befreit. Aufgrund dieses Ergebnisses scheint L227 die höchste Affinität aller drei Antikörper zu besitzen.

Die Resultate der vorherigen Immunfluoreszenzanalysen werden damit insofern bestätigt, als es sich bei dem von ID8 erkannten Epitop um eine im DR-Antigen vorkommende Determinante handeln muß. Ob es sich dabei um ein Epitop in der α - oder in einer der beiden β -Ketten handelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Auch eine assoziative Erkennung von α und β wie bei W6/23 (der die schwere Kette nur in Verbindung mit β_2 -Mikroglobulin erkennt) erscheint möglich.

(B) Klasse I-Region

Bei der Immunisierung von Mäusen durch PHA-Blasten der Zelle LEK konnte ein weiterer interessant scheinender Klon (IIH4) isoliert werden, der in den ersten Screening-Prozeduren mit dem single-cell-ELISA eine Segregation der Bindung innerhalb der Familie LE aufwies.

Eine genauere Untersuchung der Spezifität erfolgte durch Immunfluoreszenzanalyse am Zytometer. Zur Untersuchung wurden B-LCL der Eltern sowie der Kinder der Familie LE herangezogen. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigt Tabelle 15 sowie Abbildung 26:

Zelle/Antikörper	W6/32	IIH4	Haplotypen
Vater LE	79,1	60,0	(a)/(b)
Mutter LE	58,6	7,1	(c)/(d)
LET	40,9	56,4	(b)/(c)
LEK	69,0	74,0	(b)/(c)
LEV	68,0	5,8	(a)/(d)
LEC	97,3	82,7	(b)/(d)

Tabelle 15: Indirekte Immunfluoreszenz der monoklonalen Antikörper W6/32 und IIH4 auf B-LCL von Mitgliedern der Familie LE

Angaben in (%) fluoreszierender Zellen gegenüber der Negativkontrolle mit dem monoklonalen Antikörper MPC11

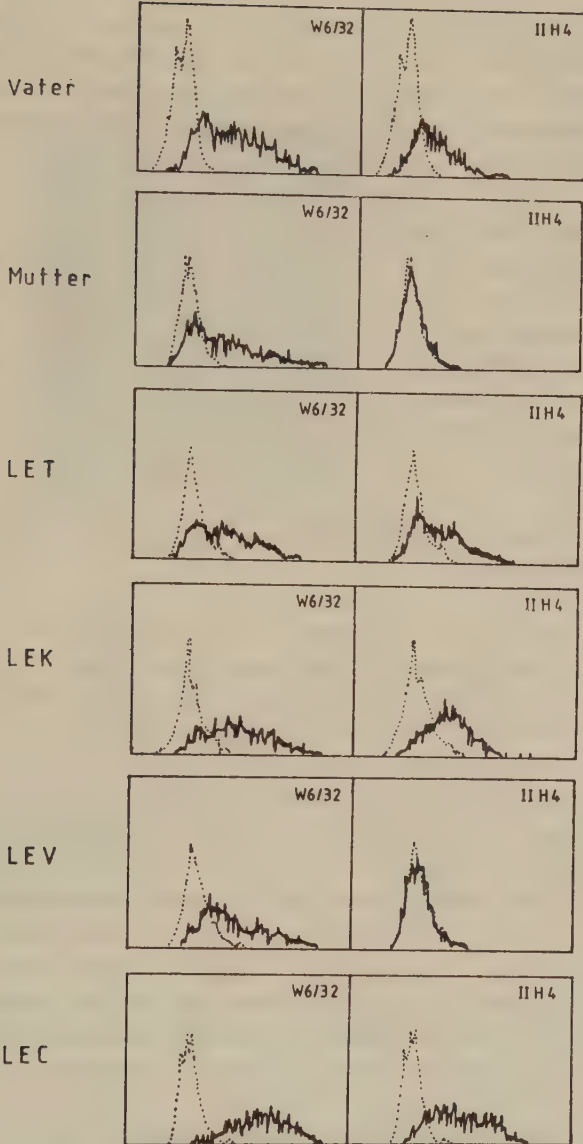


Abbildung 26: Indirekte Immunfluoreszenz mit B-LCL von Mitgliedern der Familie LE zur Analyse des monoklonalen Antikörpers IIH4

Wie zu sehen ist, segregiert die Bindung von IIH4 mit dem Haplotyp (b), der durch die HLA-Antigene A2 und B13 gekennzeichnet ist. Da sich das A2-Antigen auch auf dem (a)-Haplotyp befindet, besitzt IIH4 möglicherweise eine Spezifität für HLA B13.

Um diese Annahme zu erhärten, wurde versucht, eine Immunpräzipitation mit anschließender Gelelektrophorese durchzuführen. Auch unter Verwendung von anti-Immunglobulin-Serum, das an Protein-A-Sepharose gebunden wurde, gelang es jedoch nicht, mit IIH4 ein HLA-Antigen zu präzipitieren. Daher wurde zur Immunpräzipitation mit anschließender Gelelektrophorese ein neues Verfahren entwickelt:

Eine neue Technik zur Immunpräzipitation von HLA-Antigenen

Aufbauend auf den Ergebnisse von Brenner et al. (1985), dem es gelang, mit Hilfe eines Crosslinkers das T-Zell-Rezeptormolekül (Ti) zusammen mit dem T3-Molekül zu präzipitieren, wurde diese Technik der Verknüpfung von Oberflächenantigenen auch hier versucht.

Nach der radioaktiven Markierung der Zellen wurde im Gegensatz zu früheren Versuchen bei diesem Ansatz das Antigen vor der Lyse der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper gebunden und die so erhaltenen Komplexe mit Hilfe eines Crosslinkers (3'3'-Dithiobis(Propionsäure N-Hydroxy-succinimidester) verknüpft. Erst danach werden die Zellen wie gewohnt mit 1%igem Taurocholat lysiert und die verknüpften Antigen-Antikörper-Komplexe über anti-Immunglobulin an Protein-A-Sepharose gebunden.

Nach dem Waschen mit Salzpuffer werden die so erhaltenen Präzipitate in Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abbildung 27.

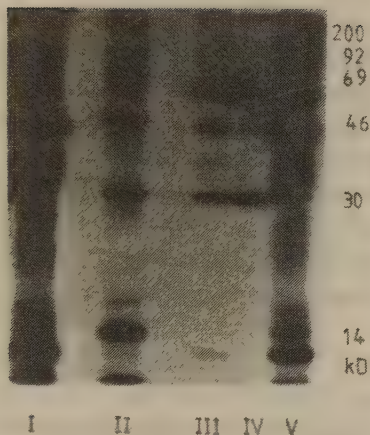


Abbildung 27: Immunpräzipitation von Antigen von LEK BLCL durch IIH4 mittels Crosslinking und anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- I: Präzipitation mit W6/32 ohne Crosslinking
- II: Molekulargewichtsmarker
- III: Präzipitation mit IIH4 und Crosslinking
- IV: Präzipitation mit anti-Immunglobulin und Crosslinking
- V: Präzipitation mit W6/32 und Crosslinking

Erstmals konnte mit dieser Methode eine Präzipitation von Klasse I-Molekülen erreicht werden, wie die Banden bei 12 kD (β_2 -Mikroglobulin) und 43 kD (schwere Kette) in Spur III zeigen. Dieses Ergebnis bekräftigt daher die Annahme der Spezifität von IIH4 für das HLA B13-Molekül.

Eine Antigen-Antikörper-Verknüpfung vor der eigentlichen Immunpräzipitation scheint eine Alternative in den Fällen zu bieten, bei denen eine Isolierung von HLA-Antigenen mit gewohnten Techniken nicht zu erreichen ist.

DISKUSSION

Optimierung der Parameter für die Analyse von HLA-Antigenen durch Isoelektrofokussierung

Um zu einer exakten Auftrennung von HLA-Molekülen und deren Subtypen entsprechend ihres isoelektrischen Punktes zu gelangen, mußten die Bedingungen für die radioaktive Markierung der Zellen, die Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper und die physikalischen Parameter der IEF gegenüber früheren Versuchen verbessert werden.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden sowohl EBV-transformierte B-LCL als auch PHA-stimulierte PBL als Ausgangsmaterial eingesetzt. Weder bei der Trennungsschärfe in der IEF noch bei der Ausbeute an präzipitierten Klasse I-Antigenen konnten Unterschiede zwischen B-Zellen und den durch PHA aktivierten T-Zellen festgestellt werden.

Bei einer Konzentration von $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml Kulturmedium wurde eine bessere Markierung der Antigene als bei höheren Zellkonzentrationen erzielt. Eine Erhöhung des Angebots an Wachstoffsstoffen, berechnet auf die einzelne Zelle führt somit bei gleicher Gesamtmenge an radioaktiv markierter Aminosäure zu einem erhöhten Stoffwechselumsatz und damit zu einer effektiveren Markierung.

Versuche zur Ermittlung der optimalen Markierungszeit für HLA-Antigene ergaben unterschiedliche Ergebnisse für Klasse I- und Klasse II-Proteine. Während Klasse II-Antigene am effektivsten bei Zeiten von 15 Stunden oder noch länger markiert werden, liegt die Zeit bei Klasse I-Proteinen bei etwa 6 Stunden. Daten aus anderen Studien zum Metabolismus von Klasse I-Antigenen (Cresswell et al., 1974; Poulik et al., 1973) zeigen, daß die Halbwertszeit dieser Proteine sowohl

vom Spender als auch vom Ort der Entnahme der Lymphocyten abhängt und im allgemeinen zwischen 90 und 270 Minuten liegt. Bei einer Markierungszeit von 6 Stunden wird somit der überwiegende Teil der Moleküle auf der Zelloberfläche markiert, ohne die Zellen übermäßig lange der Strahlung des im Medium befindlichen Isotops auszusetzen.

Versuche mit verschiedenen Detergentien ergaben bei Natrium-Taurocholat und CHAPSO die besten Ergebnisse. Bei Verwendung von Triton X-114 werden Membranproteine zwar durch Phasentrennung nach der Zellyse aufgereinigt, der effektive Ausbeuteverlust ließ dieses Detergens für unsere Zwecke als nicht geeignet erscheinen.

Eine wirkungsvolle Immunpräzipitation kann durch zwei verschiedenartige Methoden erreicht werden:

- direkte Bindung des monoklonalen Antikörpers an das im Detergens lösliche Antigen und anschließende Präzipitation mit Protein A-Sepharose (PAS) oder Staphylococcus aureus Cowan I-Zellen (SAC) oder

- Kopplung des mAb an PAS oder SAC und anschließende Präzipitation mit dem Matrix-gekoppelten Antikörper

Bei der Verwendung von hochkonzentrierten Ascitis-Präparationen von mAb der Subklasse IgG₂, konnten keine quantitativen oder qualitativen Unterschiede zwischen beiden Methoden festgestellt werden.

Bei der Verwendung von Kulturüberstand, in dem der Antikörper nur verdünnt vorliegt, muß die zweite Methode angewendet werden, genauso in den Fällen, in denen die Ig-Subklasse des Antikörpers eine Kopplung an Protein A nur über ein anti-Immunglobulinserum erlaubt. Als unlösliche Matrix bei der Präzipitation lassen sich alternativ ein kommerzielles PAS-Präparat oder fixierte Zellen des Protein A produzierenden Bakterienstammes Staphylococcus aureus Cowan I (Kessler, 1975) verwenden, die beide zu gleich guten Ergebnissen führen.

Anders als bei der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE müssen bei der IEF geladene Zuckerreste entfernt werden, da die unterschiedliche Glycosylierung entsprechend der Reifungsstufe der Antigene kaum zu einer Veränderung des Molekulargewichts, jedoch zu teilweise erheblichen Ladungsunterschieden führt.

Durch Zugabe von Neuraminidase werden die Neuraminsäuregruppen als Hauptladungsträger der Zuckerreste abgespalten. Die so behandelten Proteine zeigen einen einheitlichen isoelektrischen Punkt, der sich nicht von dem der HLA-Antigene unterscheidet, deren Glycosylierung durch Zugabe von Tunicamycin inhibiert wurde (unveröffentlichte Beobachtungen).

Gegenüber früheren Studien wurde die IEF bei einer hohen Spannung von 1000 V über 12 - 15 Stunden durchgeführt. Dies führt aufgrund der hohen Feldstärke zu einer guten Auflösung und einem scharfen Bandenmuster. Diese hohe Feldstärke wird auch durch eine Minimalisierung der Geldicke erreicht. Ultradünne Gele, wie sie hier verwendet wurden, ermöglichen außerdem eine effektivere Kühlung und somit eine schonendere Proteinanalyse.

Analyse verschiedener HLA-Antigene durch Isoelektrofokussierung

Die oben beschriebene Optimierung der Analysemethoden erlaubte nun im Gegensatz zu früheren Studien eine exakte und reproduzierbare Charakterisierung von HLA Klasse I-Antigenen und die Erfassung von serologisch nicht erkennbaren Subtypen. Durch eine genaue Zuordnung von Banden im IEF-Gel zu serologisch definierten Antigenen konnten Differenzen im isoelektrischen Punkt der Polypeptidkette einzelner Moleküle bestimmt werden.

Auf diese Weise ließen sich drei Subtypen des HLA B35-Antigens auftrennen. Ergebnisse einer anderen Arbeit (Neefjes et al., 1986) wurden im Rahmen dieser

Studie bestätigt. Von 26 serologisch als B35-typisierten Blutspendern eines Münchener Panels trugen fünf (=19,2%) den Typ B35.4, während die restlichen 21 (=80,8%) den Typ B35.1 besaßen. Alle Blutspender dieser Gruppe waren kaukasischer Herkunft. Zwei weitere Subtypen B35.2 und B35.3 sind in der oben zitierten Arbeit nur mit je einem Fall erwähnt und stammen beide aus Blutspendern orientalischen Ursprungs. Bei einer der von B. Breur-Vriesendorp (Amsterdam) zur Verfügung gestellten Zelllinien konnte B35.2 als eine dieser Varianten bestätigt werden.

Zuordnung zu CTL-definierten Subtypen

Schon bei Studien, die dieser Arbeit vorausgingen (Hahn et al., (1984), zeigte sich bei der Typisierung des B44-Antigens durch spezifische CTL eine signifikante Korrelation zwischen IEF-definiertem und "zellulärem" Subtyp. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß in diesem Fall die Erkennungsstruktur der CTL auch der Ort des ladungsverändernden Aminosäureaustausches ist. Bei der Sequenzierung des B44I-Gens zeigte sich auf Position 205 (in der α_3 -Domäne) eine bisher bei Klasse I-Antigenen einmalige Substitution des sonst üblichen Alanins durch Serin und somit eine neue Polymorphismusposition (Kottmann et al., 1986). Diese Stelle könnte somit die Erkennungsstelle dieser CTL sein.

Dagegen scheinen die CTL A.1 und A.2 nicht diejenige Determinante bei B44 zu erkennen, innerhalb derer ein Aminosäureaustausch zu den biochemisch definierten Subtypen B44I und II führt, da die IEF-Subtypen keine Korrelation zur Lysesensitivität gegenüber A.1 und A.2 zeigen.

Hinweise auf eine Subklassifizierung des B35-Antigens wurden ebenfalls durch die Generierung von spezifischen zytotoxischen T-Lymphocyten gegen B35 erhalten (Breuning et al., 1984). In dieser Studie konnten vier verschiedene Subklassen B35A - D charakterisiert werden. Mehrere Zelllinien, die diese vier Subklassen repräsentieren, wurden uns zur Verfügung gestellt und mit 1 D-IEF untersucht.

Die Ergebnisse dieser Analyse lassen folgende Aussagen zu:

Durch HLA B35-spezifische CTL lassen sich zwei Subtypen B35A und B35B definieren, die sich auch in einer Ladungsdifferenz ihres Proteinteils widerspiegeln. Zwei weitere zellulär charakterisierte Subtypen, B35C und D können in der IEF nicht von B35A bzw B35B unterschieden werden. Dieses Ergebnis widerspricht Aussagen der niederländischen Arbeitsgruppe (Neefjes et al., 1986), die dem zellulär definierten Subtyp B35C einen isoelektrischen Punkt zuordnet, der sich mit keinem der dabei beschriebenen "biochemischen" Subtypen B35.1 - 4 deckt. In einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Schiel, 1985) konnten durch spezifisch gegen B35 gerichtete CTL drei Subtypen charakterisiert werden. Mit einer Ausnahme (SCH = B35.4) tragen alle Zellen dieser Untersuchung das B35.1-Antigen, so daß in diesem Fall keine Korrelation zwischen zellulär und biochemisch definierten Subtypen gefunden werden konnte.

Die Möglichkeit der "zellulären" Subtypisierung von Antigenen durch spezifische CTL ohne erkennbare Differenzen des isoelektrischen Punktes der Proteine läßt folgende Erklärungsmöglichkeiten zu:

(1) Durch Mutation des genetischen Codes für das entsprechende Antigen entstehen ladungsneutrale Aminosäureaustausche. Beim Austausch von Aminosäuren mit annähernd gleichem isoelektrischen Punkt wird sich auch der pI des Gesamtmoleküls kaum verändern, durch die unterschiedliche Seitenkette der betreffenden Aminosäure kann es jedoch zu einer Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins kommen, die von den entsprechenden CTL erkannt wird.

(2) Ähnliches gilt auch dann, wenn die Nettoladung des Antigens durch mehrere Aminosäureaustausche kompensiert wird. In den hier durchgeführten Analysen konnten die beiden zellulär definierten B27-Subtypen -W und -C nicht voneinander getrennt werden, wohl aber B27K und B27W. B27W unterscheidet sich von B27C durch zwei Aminosäureaustausche, wobei der zweite die Ladungsveränderung des ersten Austauschs kompensiert

(Pos. 77: B27W: Asp; B27C: Ser; Pos. 156: B27W: Val; B27C: Glu;). Dagegen unterscheiden sich B27W und -K durch drei Austausche, wobei keine Ladungskompensation stattfindet (Pos. 77: B27W: Asp; B27K: Asn; Pos. 80: B27W: Thr; B27K: Ile; Pos. 81: B27W: Leu; B27K: Ala; Daten von Vega et al., 1986 sowie Seemann et al., 1986).

Um Proteine mit nahezu identischem pI aufzutrennen, kann eine alternative Fokussierungstechnik verwendet werden. Dabei werden sogenannte Immobiline** in das Gel einpolymerisiert, die unabhängig von störenden Salz- oder Pufferkonzentrationen der Probe einen stabilen pH-Gradienten gewährleisten (Bjellqvist et al., 1982). Außerdem wird bei dieser Methode die sogenannte "Kathodendrift" verhindert, die bei längeren Laufzeiten und Verwendung von Ampholinen eintritt und bei der der pH-Gradient mit zunehmender Zeit in Richtung der Kathode "wandert". Die Vorteile dieses immobilisierten pH-Gradienten liegen daher in der erhöhten Reproduzierbarkeit und einer extrem hohen Auflösungsmöglichkeit von bis zu 0,01 pH-Einheiten/cm bei ultra-engen Gradienten, die zur Analyse von Ladungsdifferenzen eingesetzt werden können, die mit den herkömmlichen Methoden nicht detektierbar sind.

(3) Auch die Erkennung eines Genprodukts, das mit B35 in engem Kopplungsungleichgewicht steht, wäre als Erklärung für die unterschiedliche Klassifizierung der untersuchten Zellen durch CML bzw. IEF denkbar. So konnten in den letzten Jahren mehr als 20 verschiedene Gene bzw. Pseudogene der HLA-Klasse I-Familie durch molekularbiologische Analysen nachgewiesen werden (Srivastava et al., 1985, Orr und de Mars, 1983). Einer der dabei entdeckten Loci zeigt zudem einen Polymorphismus. Dessen Genprodukt reagiert mit HLA-Klasse I monomorphen Antikörpern (Duceman et al., 1986) und wäre daher ein Kandidat für das oben erwähnte Antigen.

*: Immobiline®: Markenzeichen der Firma Pharmacia-LKB

(4) Aufgrund der Homologien bezüglich der Strukturen (Kaufman et al.; 1984) und der Tatsache, daß sowohl Klasse I- als auch Klasse II-restringierte T-Zellen den gleichen T-Zell-Rezeptor benutzen (Rupp et al., 1985; Marrack und Kappler, 1986), scheint eine direkte Peptid-MHC-Molekül-Bindung, die bei Klasse II-Molekülen gezeigt wurde (Sette et al., 1986) auch für Klasse I-Antigene sehr wahrscheinlich. Durch diese Peptidbindung könnte die für die Alloreaktivität wichtige Sekundärstruktur des HLA-Antigens verändert werden, ohne daß ein Aminosäureaustausch als dessen Ursache nachzuweisen ist.

Bei Untersuchung der Familie LE mit den zytotoxischen T-Zellen A.1 / A.2 wurden nur Zellen von Kindern mit den MHC-Haplotypen (b)/(c) lysiert, jedoch keine der parentalen Zelllinien, so daß anscheinend ein Zusammenwirken zweier Faktoren, die in diesem Fall mit den Haplotypen (b) und (c) segregieren, notwendig ist, um eine Sensitivität für die Lyse durch A.1 bzw. A.2 zu erreichen. Bei diesen Faktoren könnte es sich um das B35-Antigen einerseits zusammen mit einem bisher unbekanntem Faktor oder um ein mit B35 in Kopplungsungleichgewicht stehendes nichtklassisches HLA-Produkt handeln, das zusammen mit dem zweiten Faktor die Lyse durch A.1 und A.2 ermöglicht.

Assoziation zu anderen MHC-Antigenen -

"Extended Haplotype"

Viele Allele des MHC-Komplexes kommen häufig zusammen mit bestimmten Allelen anderer Loci auf diesem Abschnitt des Chromosoms vor (Awdeh et al., 1983). So konstituieren bestimmte Kombinationen aus den Loci für HLA-B, -DR sowie den Komplementfaktoren Bf, C2, C4A und C4B nahezu 30% der den MHC betreffenden Haplotypen der kaukasischen Bevölkerung (Alper et al., 1984). Erst kürzlich wurde ein solcher "Extended Haplotype" für die beiden Allele des B44-Gens beschrieben (Kuskall et al., 1987). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch bei den Subtypen von B35 solche "Extended Haplotypes" zu finden sind.

Insbesondere das Vorkommen des seltenen C4A-Alleles 3/2 (Bruun-Petersen et al., 1982; Awdeh et al., 1983; Schendel et al., 1984a und b) im Zusammenhang mit HLA-B35 veranlaßte uns zu einer solchen Vermutung. Obwohl zwischen B35 als ganzem und Cw4 ein starkes Kopplungsungleichgewicht besteht (Baur et al., 1984), konnte keine Assoziation von B35-Subtypen zu anderen Allelen des MHC-Komplexes festgestellt werden. Exakte Aussagen lassen sich jedoch wegen der geringen Probengröße (zehn Haplotypen mit B35.1, zwei Haplotypen mit B35.4) nicht treffen.

Assoziation mit Krankheiten

Eine Studie über die Assoziation von B35 mit der Schilddrüsenkrankheit der Subakuten Thyreoiditis vom Typ de Quervain im ostasiatischen Raum (Yeo et al., 1981) zeigt ein relatives Risiko von 12,65 ($X^2=15,16$) auf. Eine Untersuchung darüber, ob diese Krankheit noch enger an einen biochemisch definierten Subtyp gekoppelt ist, ergab keine schlüssigen Resultate, da sowohl Patienten als auch Kontrollprobanden den gleichen Subtyp B35.1 besitzen. Eine Untersuchung der Korrelation mit CTL-definierten Subtypen stehen jedoch noch aus. Da dieser Krankheit, die auf einer Autoimmunreaktion gegen körpereigene Substanzen beruht, vermutlich eine virale Infektion vorausgeht, wäre auch hier ein "Antigen Mimikry" zwischen B35 und viralen Determinanten denkbar, wobei durch die Infektion CTL aktiviert werden könnten, die im späteren Verlauf gegen eigene Zellen mit dem B35-Antigen reagieren. Bei gesunden B35-Trägern fehlt möglicherweise diese vorausgehende Aktivierung des Immunsystems oder sie richtet sich gegen Subtypen von B35, die durch IEF nicht zu unterscheiden sind. Eine weitere Möglichkeit wäre auch in diesem Fall die Beteiligung eines Gens, das mit B35 in Kopplungsungleichgewicht steht und das bei den Patienten, nicht jedoch bei den Kontrollprobanden exprimiert wird.

Schließlich könnte eine fehlerhafte Präsentation von viralem Peptid durch das HLA-Antigen vorliegen, so daß es in diesen Fällen im weiteren Verlauf zu einer Hypersensitivität kommt.

Antigen Mimikry - gleichzeitige Erkennung von Allo- und Virus- + Selbstantigenen

In CML-Assays konnten bei Stimulation von PBL einer Zelllinie MUG mit B35- oder B44-tragenden Zellen zytotoxische T-Lymphocyten generiert werden, die auch mit Zielzellen reagieren, die das andere (nicht das "Stimulationsantigen") der beiden Antigene besitzen. Zusätzlich zu dieser ungewöhnlichen Reaktivität dieser CTL A.1 und A.2 mit einer mit B35 und B44 verbundenen Zielzell determinante erkennen diese zytotoxischen T-Zellen auch autologe EBV-transformierte B-Lymphocyten.

Dieses "Antigen Mimikry" wurde schon früher von Gaston et al. (1983) berichtet. Übereinstimmend mit deren Ergebnissen tragen die Effektorzellen bei diesem ungewöhnlichen Reaktionsmuster das Antigen HLA B8. Weitere Versuche zeigten, daß aus einer weiteren Zelllinie GAH bei geeigneter Stimulation CTL mit einer solchen Spezifität generiert werden können. Gemeinsam mit dem ursprünglichen Effektor trägt auch sie das Antigen B8. Aus verschiedenen anderen B8-tragenden Zellen konnten jedoch keine Effektorzellen mit ähnlichem Erkennungsmuster gewonnen werden.

Diese Beobachtung könnte ihre Ursache in einer Heterogenität von B8 haben. Da sich in der 1 D-IEF jedoch keinerlei Hinweise auf das Vorkommen von Subtypen dieses Antigens ergaben, lassen sich B8-Varianten nicht für eine unterschiedliche Restriktion verantwortlich machen.

Möglicherweise ist die Ursache dieser Beobachtung auch in diesem Fall ein Kopplungsungleichgewicht des B8-Allels mit einem weiteren bisher unbekannten Molekül, das als Restriktionselement dient und bei den Zellen MUG und GAH, nicht jedoch bei den übrigen untersuchten Zellen vorliegt.

Allerdings wäre auch ein Polymorphismus bei den Genen für den T-Zell-Rezeptor der Effektorzellen denkbar, der ihnen erlaubt, CTL mit speziellen Erkennungsstrukturen für beide Antigentypen zu aktivieren.

Schließlich könnte diese unterschiedliche Reaktion des Antigen Mimikry zwischen Selbst- und Allodeterminanten auch auf einen unterschiedlichen "immunologischen Hintergrund" der verschiedenen Spender zurückzuführen sein. So wäre es denkbar, daß bei bestimmten Blutspendern durch eine frühe EBV-Infektion eine Toleranz gegen die betreffende Determinante induziert wurde, die eine Generierung von kreuzreagierenden Zellen verhindert.

Detektion von HLA C-Antigenen durch Immunpräzipitation mit W6/32

Obwohl das Hauptziel dieser Arbeit vor allem die Charakterisierung von Produkten des HLA B-Lokus war, konnten auch interessante Beobachtungen bezüglich anderer Antigene wie zum Beispiel solcher des C-Lokus gemacht werden. Über den Polymorphismus dieses HLA-Bereichs gibt es durch den Mangel an hochaffinen Antisera erst wenige zuverlässige Daten. Ebenso wie bei der serologischen Typisierung sind HLA C-Antigene auch durch spezifische zytotoxische Zellen nur sehr schwer zu charakterisieren (Kristensen und Grunnet, 1975).

Güssow et al. (1987) sowie Stam et al. (1986) berichten von einer fehlenden Aktivität von W6/32 mit Cw1- und Cw2-Antigenen, die auf eine schwache oder fehlende Assoziation der schweren Kette mit β 2-Mikroglobulin zurückgeführt wird. Andererseits ist jedoch die Assoziation mit β 2-Mikroglobulin notwendig, um eine Expression an der Zelloberfläche zu ermöglichen (Siden et al., 1981). In einem Vergleich aller Cw2 typisierten Zellen konnten wir ein Bandenmuster beobachten, das dem ähnelt, das durch Präzipitation mit einem Antikörper gegen die schwere Kette des Dimers (HC-10) erhalten wurde. Das Vorkommen von mehreren Banden pro Allel ist möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen

zurückzuführen. Ob die schwächere Bindung von W6/32 gegenüber A- und B-Antigenen auf Strukturveränderungen im Vergleich zu diesen Proteinen oder einen anderen Metabolismus (höhere Umsatzrate oder verringerte Genexpression) zurückzuführen ist, könnte unter anderem durch quantitative Northern-Blot-Analysen der mRNA dieser bereits sequenzierten Gene (Cw1, Cw2: Güssow et al., 1987; Cw3: Sodoyer et al., 1984) aufgeklärt werden.

Monoklonale Antikörper gegen HLA-Antigene

Da die Natur der von A.1 und A.2 erkannten Determinante nicht durch IEF aufgeklärt werden konnte und möglicherweise nicht auf den untersuchten HLA-Antigenen selbst liegt, wurde versucht, gegen die betreffende Struktur monoklonale Antikörper zu gewinnen. Nach Immunisierung von Mäusen mit Zielzellen von A.1/A.2 konnten in Versuchen, die dieser Arbeit vorausgingen, drei Hybridomklone selektiert werden, deren Spezifität weiter untersucht wurde.

Durch Immunfluoreszenzanalyse konnte bei zwei von ihnen (IG7 und ID8) ein charakteristisches Bindungsmuster an Mutanten der Zelllinie Raji und damit eine Spezifität für Klasse II-Antigene festgestellt werden. Beide Antikörper binden sowohl an das DR $\alpha\beta$ 1-Molekül, als auch an das DR $\alpha\beta$ 11-Molekül, wie bei Versuchen mit Maus-L-Zellen, die mit den entsprechenden Genen transfiziert wurden, gezeigt werden konnte. Eine Spezifität von ID8 für das DR-Antigen wurde durch eine sequentielle Immunpräzipitation mit DR-spezifischen monoklonalen Antikörpern (L243 und L227) gezeigt. Ob diese Determinante in der α - oder der β -Kette des Dimers liegt, sollte durch einen Immunoblot geklärt werden. Da ID8 jedoch nicht mit dem denaturierten Antigen auf dem Blot zu binden scheint, sind zuverlässige Aussagen über die Lokalisation des Epitops noch nicht möglich.

Ein dritter Klon, IIH4, produziert einen Antikörper, der eine polymorphe Determinante des Klasse I-Antigens, möglicherweise HLA B13 erkennt. Dieses Ergebnis wurde durch Immunfluoreszenzanalyse an Zellen einer Familie, in der dieses Allel segregiert, sowie durch

Immunpräzipitation mit anschließender SDS-PAGE erhalten. Hierbei wurde eine neue Technik für die Präzipitation von HLA-Antigenen entwickelt, bei der Antigen-Antikörper-Komplexe vor ihrer Präzipitation durch einen Crosslinker quervernetzt werden. Die Spezifität von IIH4 für B13 wurde durch spätere Bindungsstudien an einem größeren Panel von Zellen unverwandter Blutspender und schließlich im Rahmen des X. Internationalen Histokompatibilitäts-Workshops bestätigt, bei dem sich ein Korrelationskoeffizient von 0,85 mit diesem Antigen ergab (XIHWS Newsletter, 1987; Serum Nr. 1250).

Ein monoklonaler Antikörper gegen das HLA B35-Antigen konnte in unserem Labor bisher nicht gewonnen werden. Möglicherweise gibt es in der Struktur dieses Moleküls Epitope, die für CTL leichter zugänglich sind als für B-Zellen mit ihren Immunglobulin-Rezeptoren. Andere Gründe für die Schwierigkeit, monoklonale Antikörper gegen die Erkennungsstruktur von spezifischen CTL zu finden, wurden bereits im ersten Abschnitt dieses Kapitels erörtert.

Eine genauere Aufklärung über unterschiedliche Klassifizierungsmöglichkeiten von HLA-Antigenen durch CTL und IEF kann wohl nur durch Analyse der DNA-Sequenzen von Subtypen dieser Proteine oder der mit ihnen in Kopplungsungleichgewicht stehenden Allele erreicht werden. Die Ergebnisse dieser zukünftigen Arbeit versprechen ebenso wie die Röntgenstrukturanalyse nicht nur Aufklärung über den großen Polymorphismus dieser Glycoproteine sondern auch Informationen über deren wichtige Funktion innerhalb des menschlichen Immunsystems.

ZUSAMMENFASSUNG

In einer gemischten Population von Lymphocyten mit unterschiedlichen HLA-Antigenen können zytotoxische T-Lymphocyten generiert werden, die das jeweils "fremde" Alloantigen erkennen. Durch diese zytotoxischen Zellen lassen sich Subtypen verschiedener serologisch einheitlicher HLA-Antigene definieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel von HLA B35 und B44 untersucht, ob sich zellulär definierte Subtypen dieser Antigene mit Unterschieden im isoelektrischen Punkt bei diesen Glycoproteinen korrelieren lassen. Die Analyse dieser pI-Differenzen erfolgte durch eindimensionale Isoelektrofokussierung.

Durch CTL, die spezifisch gegen das B44-Antigen gerichtet sind, lassen sich Subtypen charakterisieren, die denjenigen entsprechen, welche in der 1 D-IEF zu beobachten sind. Bei HLA B35 trifft diese Korrelation nicht zu. Bei diesem Antigen können durch CTL mindestens drei Untergruppen definiert werden, die sich durch Isoelektrofokussierung nur zum Teil unterscheiden lassen. Mithilfe der Isoelektrofokussierung können zwei häufig vorkommende B35-Subtypen klassifiziert werden, eine dritte wurde nur in einem Fall bei einem Spender orientalischer Herkunft beobachtet.

Auch durch zytotoxische T-Zellen, die mit B35 und B44 kreuzreagieren, lassen sich jeweils zwei Subtypen dieser beiden Antigene charakterisieren, die jedoch in keinem Fall mit den in der IEF beobachteten pI-Differenzen korrelieren.

Diese CTL, die auch mit autologen EBV-transformierten B-Zellen reagieren, stammen aus zwei Blutspendern, die als gemeinsames Merkmal das HLA B8-Antigen tragen. Aus weiteren Spendern mit diesem Antigen konnten jedoch bei

gleicher Stimulation keine solchen kreuzreagierenden CTL gewonnen werden. Diese unterschiedliche Reaktivität kann jedoch nicht auf das Vorkommen verschiedener HLA B8-Subtypen zurückgeführt werden, die für eine unterschiedliche Restriktion bei der Erkennung von viralen Antigenen verantwortlich zu machen sind.

Ein Kopplungsungleichgewicht zu anderen Produkten des MHC, wie es für die Subtypen von B44 beschrieben ist, konnte bei B35 nicht beobachtet werden.

Auch konnte keine Korrelation zwischen der mit B35 assoziierten Schilddrüsenerkrankung der de Quervain'schen Thyreoiditis und IEF-definierten Subtypen dieses Antigens gezeigt werden.

Bei dem Versuch, monoklonale Antikörper gegen die von CTL erkannten Epitope dieser Antigene oder damit in Kopplungsungleichgewicht stehender Genprodukte zu gewinnen, wurden drei Antikörper genauer charakterisiert, von denen zwei ein bei allen Klasse II Antigenen vorkommendes Epitop erkennen, ein dritter ist für das Klasse I-Antigen HLA B13 spezifisch. Bei der Präzipitation dieses Antigens wurde eine neue Technik, die auf einer Vernetzung von Antigen-Antikörperkomplexen beruht, angewendet.

LITERATURVERZEICHNIS

Accolla, R. S. (1983): Human B cell variants immunoselected against a single Ia-antigen subset have lost expression of several Ia-antigen subsets.
J. Exp. Med. 157, 1053-1058

Albert, E. D., M. P. Baur, W. R. Mayr (Ed.) (1984): *Histocompatibility Testing 1984*. Springer Verlag, Heidelberg

Alper, C. A. (1981): Complement and the MHC. In M. E. Dorf (Ed.) *The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology*, Garland, New York, 173-220

Alper, C. A., D. Raum, S. Karp, Z. L. Awdeh und E. J. Yunis (1983): Serum complement "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (clonotypes). *Vox. Sang.* 45, 62-67

Alper, C. A., Z. L. Awdeh, D. Raum, K. E. Fleischnik und E. J. Yunis (1984): Complement genes of the human histocompatibility complex: Implications for linkage disequilibrium and disease associations. In G. S. Panagi und C. S. David, (Ed.): *Immunogenetics*, Butterworths, London, 50-91

Awdeh, Z. L., D. Raum, E. J. Yunis und C. A. Alper (1983): Extended HLA/complement allele haplotypes: Evidence for T/t complex in man.
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 259-263

Babbitt, B. P., P. M. Allen, G. Matsueda, E. Haber und E. R. Unanue (1985): Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359-361

Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, G. Brown, B. B. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams und A. Ziegler (1978): Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - new tools for genetic analysis.
Cell 14, 9-20

Baur, M. P., M. Neugebauer und E. D. Albert (1984): Reference tables of two-locus haplotype frequencies for all MHC marker loci. In E. D. Albert, M. P. Baur und W. R. Mayr (Ed.) *Histocompatibility Testing 1984*, Springer-Verlag Berlin, 677-755

Beck, S. und B. G. Barrell (1988): Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 331, 269-272

Berggård, I. und A. G. Bearn (1968): Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids.
J. Biol. Chem. 243, 4095-4103

Bech, K., J. Nerup, M. Thomsen, P. Platz, L. P. Ryder, A. Svejgaard, K. Siersboek und J. E. Molholm (1977): Subacute thyroiditis De Quervain: A disease associated with a HLA-B antigen. *Acta Endokrinol.* 86, 504-509

Bevan, M. J. (1977): Killer cells reactive to altered-self antigens can also be alloreactive.
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2094-2098

Biddison, W. E., M. S. Krangel, J. L. Strominger, F. E. Ward, G. M. Shearer und S. Shaw (1980): Virus-immune cytotoxic T-cells recognize structural differences between serologically indistinguishable HLA-A2 molecules. *Hum. Immunol.* 3, 225-232

Biddison, W. E., G. M. Shearer und S. Shaw (1981): Influenza virus-specific T cells are restricted by multiple HLA-A3-related self antigens: Evidence for recognition of distinct self structures in conjunction with different foreign antigens.
J. Immunol. 127, 2231-2235

Biddison, W. E., D. D. Kostyu, J. L. Strominger und M. S. Krangel (1982): Delineation of immunologically and biochemically distinct HLA-A2 antigens.
J. Immunol. 129, 730-734

Bidwell, J. (1988): DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunology Today* 9, 18-23

Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier und W. Postel (1982): Isoelectric focusing in immobilized pH-gradients: Principle, methodology and some applications.
J. Biochem. Biophys. Meth. 6, 317-339

Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger und D. C. Wiley (1987a): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512

Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger und D. C. Wiley (1987b): The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.
Nature 329, 512-518

Bodmer, W. F. und J. G. Bodmer (1978): Evolution and function of the HLA system. *Br. Med. Bull.* 34, 309-316

Bordier, C. (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution.
J. Biol. Chem. 256, 1604-1607

Brenner, M. B., I. S. Trowbridge und J. L. Strominger (1985): Cross-linking of human T cell receptor proteins: Association between the T cell idiotype β subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40, 183-190

Breuning, M. H., C. J. Lukas, B. S. Breur, M. Y. Engelsma, G. G. de Lange, A. J. Dekker, W. E. Biddison und P. Ivanyi (1982): Subtypes of HLA-B27 detected by cytotoxic T lymphocytes and their role in self recognition. *Hum. Immunol.* 5, 259-268

Breuning, M. H., B. S. Breur, M. Y. Engelsma, E. Goulmy und P. Ivanyi (1984): Activation of cytotoxic T lymphocytes in HLA-A, -B and -C identical responder-stimulator pairs
II. New subtypes of HLA-Bw35. *Tissue Antigens* 24, 90-97

Breur-Vriesendorp, B. S., J. J. Neefjes, B. Huis, G. A. van Seventer, H. L. Ploegh und P. Ivanyi (1986): Identification of new B27 subtypes (B27C and B27D) prevalent in oriental populations. *Hum. Immunol.* 16, 163-168

Brewerton, D. A., M. Caffrey, F. D. Hart, D. C. O. James, A. Nicholls und R. D. Sturrock (1973): Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* i, 904-907

Bruun-Petersen, G., U. Lamm, B. K. Jacobsen und T. Kristensen (1982): Genetics of complement C4 - two homoduplication haplotypes C4S-C4S and C4F-C4F in a family. *Hum. Genet.* 61, 36-38

Buus, S., S. Colon, C. S. Smith, J. H. Freed, C. Miles und H. M. Grey (1986): Interaction between a processed ovalbumin peptide and Ia molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 3968-3971

Buus, S., A. Sette, S. M. Colon, C. Miles und H. M. Grey (1987): The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 235, 1353-1358

Carroll, M. C., P. Katzman, E. M. Alicot, B. H. Koller, D. E. Geraghty, H. T. Orr, J. L. Strominger und T. Spies (1987): Linkage map of the human histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 8535- 8539

Clark, B. D., M. S. Park, R. Tonai und P. I. Terasaki (1987): Serologic and biochemical analysis of HLA B15 and B5 complexes. *Hum. Immunol.* 20, 47-57

Cowan, E. P., J. E. Coligan und W. E. Biddison (1985): Human CTL recognition of an HLA-A3 gene product expressed on murine L cells. The only human gene product required on the target cells for lysis is the class I heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4490-4494

Cresswell, P., T. Springer, J. L. Strominger, M. J. Turner, H. M. Grey und R. T. Kubo (1974): Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens and β_2 -microglobulin and its turnover on the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 2123-2127

de Waal, L. P., H. J. Mesman und C. P. Engelfriet (1987): Serological and biochemical identification of HLA-Aw33 subtypes. *Immunogenetics* 26, 211-215

Duceman, B. W., D. Ness, R. Rende, M. J. Chorney, Srivastava R., D. S. Greenspan, J. Paw, S. M. Weissman und F. C. Grumet ((1986): HLA-JY328: Mapping studies and expression of a polymorphic HLA class I gene. *Immunogenetics* 23, 90-99

Ferrier, P., C. Layet, D. H. Caillol, B. R. Jordan und F. A. Lemonnier (1985): The association between murine β_2 -microglobulin and HLA-class I heavy chains results in serologically detectable conformational changes of both chains. *J. Immunol.* 135, 1281-1287

Ford, W. C., S. J. Simmonds und R. C. Atkins (1975): Early cellular events in a systemic graft vs. host reaction. II. Autoradiographic estimates of frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex. *J. Exp. Med.* 141, 681-696

Gaston, J. S. H., A. B. Rickinson und M. A. Epstein (1983): Cross-reactivity of self-HLA restricted Epstein-Barr-Virus specific cytotoxic T lymphocytes for allo-HLA determinants. *J. Exp. Med.* 158, 1804-1812

Grey, H. M., R. T. Kubo, S. M. Colon, M. D. Poulik, P. Cresswell, T. Springer, M. Turner und J. L. Strominger (1973): Small subunit of HL-A-antigens is β_2 -microglobulin. *J. Exp. Med.* 138, 1608-1612

Goodfellow, P. N., E. A. Jones, V. van Heyningen, E. Solomon, M. Bobrow, V. Miggiano und W. F. Bodmer (1975): The β_2 -microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A-region. *Nature* 254, 267-269

Götze, D. (Ed.) (1977): *The Major Histocompatibility System in Man and Animals*, Springer Verlag, Berlin

Güssow, D., R. S. Rein, I. Meijer, W. deHoog, G. H. A. Seemann, F. M. Hochstenbach und H. L. Ploegh (1987): Isolation, expression, and the primary structure of HLA-Cw1 and HLA-Cw2 genes: Evolutionary aspects. *Immunogenetics* 25, 313-322

Hahn, A. W. A., D. J. Schendel, P. W. Hansen und H. L. Ploegh (1984): Biochemical and cellular identification of HLA-Bw44 subtypes. *Hum. Immunol.* 11, 69-76

Kahn-Perles, B., C. Boyer, B. Arnold, A. R. Sanderson, P. Ferrier and F. A. Lemonnier (1987): Acquisition of HLA class I W6/32 defined antigenic determinant by heavy chains from different species following association with bovine β_2 -microglobulin. *J. Immunol.* 138, 2190-2196

Kaneoka, H., E. G. Engleman und F. C. Grumet (1983): Immunochemical variants of HLA-B27. *J. Immunol.* 130, 1288-1292

Kaufman, J. F., C. Auffray, A. J. Korman, D. A. Shackelford und J. L. Strominger (1984): The class II molecules of the human and murine histocompatibility complex. *Cell* 36, 1-13

Kessler, S. W. (1975): Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal Protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with Protein A. *J. Immunol.* 115, 1617-1634

Klein, J. (1979): The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203, 516-521

Kottmann, A. H., G. H. A. Seemann, H. D. Guessow und M. H. Roos (1986): DNA sequence of the coding region of the HLA-B44 gene. *Immunogenetics* 23, 396-400

Krangel, M. S., H. T. Orr und J. L. Strominger (1979): Assembly and maturation of HLA-A and HLA-B antigens in vivo. *Cell* 18, 979-991

Kristensen, T., N. Grunnet (1975): Cell-mediated lympholysis in man. Evidence of a separate CML locus within the major histocompatibility complex and an approach to CML typing. In F. Kissmeyer-Nielsen (Ed.) *Histocompatibility Testing 1975*, Munksgaard, Copenhagen, 835-844

Kuskall, M. S., E. E. Eynon, Z. Awdeh, C. A. Alper und E. J. Yunis (1987): Identification of HLA-B44 subtypes associated with extended MHC haplotypes. *Immunogenetics* 26, 216-219

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lampson, L. A. und R. Levy (1980): Two populations of Ia-like molecules on a human B-cell-line. *J. Immunol.* 125, 293-299

Lopez de Castro, J. A., H. T. Orr, T. Kostyk, D. L. Mann und J. L. Strominger (1979): Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B7. I. Isolation and composition of fragments and of tryptic and chymotryptic peptides. *Biochemistry* 18, 5704-5711

Maloy, W. L. und J. E. Coligan (1985): Is β_2 -microglobulin required for MHC class I heavy chain expression? *Immunology Today* 6, 263-264

Marrack, P und J Kappler (1986): *Adv. Immun.* 38, 1-30

McLaughlin-Taylor, E., J. G. Woodward, M. McMillan und J. A. Frelinger (1984): Distinct epitopes are recognized by cytolytic T-lymphocyte clones on the same class I molecule: Distinct demonstration using DNA-transfected targets and long term cytolytic T-cell clones. *Eur. J. Immunol.* 14, 969-974

Morton, C. L., I. R. Kirsch, W. E. Nance, G. A. Evans, A. J. Korman und J. L. Strominger (1984): Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 2816-2820

Moss, D. J., I. S. Misko, S. R. Burrows, K. Burman, R. McCarthy und T. B. Sculley (1988): Cytotoxic T-cell clones discriminate between A- and B-type Epstein-Barr virus transformants. *Nature* 331, 719-721

Mota, A. H., H. Fainboim, R. Terg und L. Fainboim (1987): Association of chronic active hepatitis and HLA B35 in patients with Hepatitis B Virus. *Tissue Antigens* 30, 238-240

Neefjes, J. J., B. S. Breur-Vriesendorp, G. A. van Seventer, P. Ivanyi und H. L. Ploegh (1986): An improved biochemical method for the analysis of HLA-class I antigens. Definition of new HLA-class I subtypes. *Hum. Immunol.* 16, 169-181

Neefjes, J. J., I. Doxiadis, N. J. Stam, C. J. Beckers und H. L. Ploegh (1986b): An analysis of class I antigens of man and other species by one-dimensional IEF and immunoblotting. *Immunogenetics* 23, 164-171

Nyulassy, S., P. Hnilica und J. Stefanovic (1975): The HL-A system and sub-acute thyroiditis. *Tissue Antigens* 6, 105-106

Orr, H. T., J. A. Lopez de Castro, D. Lancet und J. L. Strominger (1979): Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B7. II. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry* 18, 5711-5719

Orr, H. T., und R. DeMars (1983): Class I-like HLA genes map telomeric to the HLA-A2 lokus in mammalian cells. *Nature* 302, 534-536

Owen, M. J. und A. M. Kissonerghis (1980): Biosynthesis of HLA-A and HLA-B antigens in vitro. *J. Biol. Chem.* 255, 9678-9684

Parham, P., R. E. Humphreys, M. J. Turner und J. L. Strominger (1974): Heterogeneity of HLA-antigen preparations is due to variable sialic acid content. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 3998-4003

Parham, P. (1987): Functional sites of human class I MHC molecules: Paradigms a dozen? *Immunol. Res.* 6, 153-178

Poulik, M. D., M. Bernoco, D. Bernoco und R. Ceppellini (1973): Aggregation of HL-A antigens at the lymphocyte surface induced by antiserum to β_2 -microglobulin. *Science* 182, 1352-1354

Rein, R. S., G. H. A. Seemann, J. J. Neefjes, F. M. H. Hochstenbach, N. J. Stam und H. L. Ploegh (1987): Association with β_2 -microglobulin controls the expression of transfected human class I genes. *J. Immunol.* 138, 1178-1183

Rupp, F., H. Acha-Orbea, H. Hengartner, R. Zinkernagel und R. Joho (1985): Identical V_α -T-cell receptor genes used in alloreactive cytotoxic and antigen plus I-A specific helper T-cells. *Nature* 315, 425-427

Ryser, J. E. und H. R. MacDonald (1979): Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T lymphocytes. I. Comparison of precursor frequencies for proliferative and cytolytic responses. *J. Immunol.* 122, 1691-1696

Schendel, D. J., R. Wank, J. A. Hansen und B. Dupont (1977): Cell-mediated lympholysis in man: Identification of a common target determinant associated with HLA-B12 and Bw35. *Transplant. Proc.* 9, 1777-1780

Schendel, D. J. und R. Wank (1981): Noncodominant expression of target antigens recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Hum. Immunol.* 2, 91-101

Schendel, D. J., G. J. O'Neill und R. Wank (1984a): MHC-linked class III genes. Analysis of gene frequencies, complotypes, and associations with distinct HLA haplotypes in german caucasians. *Immunogenetics* 20, 23-31

Schendel, D. J., R. Wank, und G. J. O'Neill (1984b): C4 phenotypic variation suggests an unusual class III gene organisation. *Vox. Sang.* 48, 110-115

Schendel, W. Jennert, K. Bickert und R. Wank (1984c): Joint report: Cell-mediated lympholysis. A method for cellular typing. In E. Albert, M. Baur und W. Mayr, (Ed.) : *Histocompatibility Testing 1984*, Springer Verlag Berlin, 306-312

Schiel, A. (1985): Analyse von HLA-Klasse I Antigenen mittels zell-vermittelter Lympholyse, *Diplomarbeit am Institut für Immunologie der Universität München*

Schlosstein, L., P. I. Terasaki, R. Bluestone und G. M. Pearson (1973): High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N. Engl. J. Med.* 288, 704-706

Seemann, G. H. A., R. S. Rein, C. S. Brown und H. L. Ploegh (1986): Gene conversion-like mechanisms may generate polymorphism in human class I genes. *EMBO J.* 5, 547-552

Sette, A., S. Buus, S. Colon, J. A. Smith, C. Miles und H. M. Grey (1987): Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* 328, 395-399

Shimonkevitz, R., J. Kappler, P. Marrack und H. Grey (1983): Antigen-recognition by H-2 restricted T-cells. I. Cell-free antigen processing. *J. Exp. Med.* 158, 303-316

Simmons, R. L., C. Lopez, H. Balfour, J. Kalis, L. C. Rattazzi und J. S. Najarian (1974): Cytomegalovirus - clinical virological correlations in renal transplant recipients. *Ann. Surg.* 180, 623

Sodoyer, R., M. Damotte, T. L. Delovitch, J. Trucy, B. R. Jordan und T. Strachan (1984): Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-CW3). *EMBO J.* 3, 879-885

Srivastava, R., B. Ducean, P. A. Biro, A. K. Sood und S. M. Weissman (1985): Molecular organization of the class I genes of the human major histocompatibility complex. *Immunol. Rev.* 84, 93-112

Stam, N. J., H. Spits und H. L. Ploegh (1986): Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterisation of certain HLA-C locus products. *J. Immunol.* 137, 2299-2306

Svensson, H. (1961): Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. The different equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta. Chem. Scand.* 15, 325-341

Tekolf, W. A., W. E. Biddison, R. D. Aster und S. Shaw (1982): Two subgroups of HLA-Bw44 defined by cell mediated lympholysis that differ in Bw44 expression by platelets and in patterns of genetic linkage disequilibrium. *J. Immunol.* 129, 1474-1478

Terasaki, P. I. (Ed.), (1980): *Histocompatibility Testing 1980*, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles

Thorley-Lawson, D. A. und E. S. Israelsohn (1987): Generation of specific cytotoxic T cells with a fragment of the Epstein-Barr-Virus encoded p63/latent membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 5384-5388

Townsend, A. R. M., J. Rothbard, F. M. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith und A. J. McMichael (1986): The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytolytic T-lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44, 959-968

van der Poel, J. J., H. Mölders, A. Thompson und H. L. Ploegh (1983): Definition of four HLA-A2 subtypes by CML typing and biochemical analysis. *Immunogenetics* 17, 609-621

Vasilov, R. G., A. Hahn, H. Mölders, J. J. van Rood, M. Breuning und H. L. Ploegh (1983): Analysis of human class I antigens by two-dimensional gel electrophoresis. I Polymorphism, evidence for additional (Non-HLA-A,B,C) gene products and identification of variant HLA-A, B antigens. *Immunogenetics* 17, 333-356

Vega, M. A., R. Bragado, P. Ivanyi, J. L. Pelaez und J. A. Lopez de Castro (1986): Molecular analysis of a functional subtype of HLA B27. A possible evolutionary pathway for HLA-B27 polymorphism. *J. Immunol.* 137, 3557-3565

von Boehmer, H., H. Hengartner, M. Nabholz, W. Lehnhardt, M. Schreier und W. Haas (1979): Fine specificity of a continuously growing killer cell clone specific for H-Y antigen. *Eur. J. Immunol.* 9, 592-597

Yang, S. Y., Morishima Y., N. H. Collins, T. Alton, M. S. Pollak, E. J. Yunis und B. Dupont (1984): Comparison of one-dimensional IEF patterns for serologically detectable HLA-A and B allotypes. *Immunogenetics* 19, 217-231

Yang, S. Y., A. Chang, R. Olivero, V. Relias und E. J. Yunis (1985): IEF Patterns of HLA-B13 antigens from orientals and caucasians. *Immunogenetics* 21, 125-134

Yeo, P. P. B., S. H. Chan, T. C. Aw, K. F. Lui, A. Rauff, T. Mathew et al. (1981): HLA and chinese patients with subacute (De Quervain's) thyroiditis. *Tissue Antigens* 17, 249-250

Zemmour, J., P. D. Ennis, P. Parham und B. Dupont (1988): Comparison of the structure of HLA Bw47 to HLA B13 and its relationship to 21-hydroxylase deficiency. *Immunogenetics* 27, 281-287

Zinkernagel, R. M. und P. D. Doherty (1974): Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic chorio-meningitis within a syngeneic or semi-allogeneic system. *Nature* 248, 701-702

Ich danke

besonders Frau Prof. Dr. D. J. Schendel für Themenstellung und die Arbeitsmöglichkeit in ihrem Labor sowie die Unterstützung, die sie dieser Arbeit entgegenbrachte; ohne die Daten der CML-Tests, die mir zur Verfügung gestellt wurden, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen;

den Mitarbeitern des Labors von Dr. Hidde Ploegh in Amsterdam, die mich in die Technik der 1 D-Isoelektrofokussierung von HLA-Antigenen einführten;

Herrn Prof. Dr. G. Riethmüller für die Möglichkeit, am Institut für Immunologie zu arbeiten;

Herrn Dr. R. Wank und seinen Mitarbeitern, besonders Birgit Göhring, die die serologischen HLA-Typisierungen durchführten und mir zur Verfügung stellten und damit erst diese Arbeit ermöglichten;

allen Mitarbeitern des Labors von Prof. Schendel, besonders Elfriede Nößner und Gaby Multhoff für die vielen interessanten Diskussionen, die meine Arbeit unterstützten, Barbara Keil für ihre Hilfe bei der Zellkultur und Eckhart Kämpgen für die Einführung in die Textverarbeitung;

Frau Dr. Johnson und ihren Mitarbeitern für die Überlassung von monoklonalen Antikörpern und Zelllinien, Hellmuth Nordwig für die anregenden Gespräche über die Technik der Isoelektrofokussierung;

Dr. Jörg Prinz, der mich auf die Idee brachte, eine neue Präzipitationstechnik zu versuchen und Rudolf Gruber für die Hilfe am FACScan-Zytometer;

Herrn Prof. Dr. H. Cleve für die bereitwillige Übernahme der Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät;

Lebenslauf

Name: Erich Lederer

wohnhaft in: 8011 Vaterstetten,
Franz-Lehar-Str. 3

Geburtsdatum, Geburtsort: 2. November 1959 in München

Schulbildung: 1966 - 1970 Grundschule in
Vaterstetten bei München
1970 - 1979: Gymnasium
Vaterstetten; Abitur

Studium: Biologiestudium an der Ludwig-
Maximilians-Universität in
München

Diplomarbeit: Thema: Amphiphile Polymere in
der Zellhülle von Clostridien

Betreuer: Prof. Dr. F. Fiedler

Ort der Durchführung: Mikrobiologisches Institut der
Universität München

Diplom: 3. Februar 1986

Promotion: Seit April 1986 am Institut für
Immunologie der Ludwig Maximi-
lians-Universität in München

Betreuerin: Prof. Dr. D. Schendel

